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

Aplicação de imunoensaios para a triagem da cisticercose
suína em animais com baixa carga parasitária

Andréia Bartachini Gomes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dra Adelaide José Vaz

São Paulo
2006

ANDRÉIA BARTACHINI GOMES

Aplicação de imunoensaios para triagem da cisticercose
suína em animais com baixa carga parasitária

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas para obtenção do grau de
MESTRE em Farmácia

Área de Concentração: Análises Clínicas
Orientadora: Prof^a Dra Adelaide José Vaz

São Paulo
2006

JB.470

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011692

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

G633a Gomes, Andréia Bartachini
Aplicação de imunoensaios para a triagem da cisticercose
suína em animais com baixa carga parasitária / Andréia
Bartachini Gomes. -- São Paulo, 2006.
127p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Vaz, Adelaide José

1. Doença parasitária : Imunologia 2. Imunoensaio 3.
Triagem sorológica I. T. II. Vaz, Adelaide José, orientador.

616.96079 CDD

Andréia Bartachini Gomes

Aplicação de Imunoensaios para triagem da cisticercose suína em
animais com baixa carga parasitária

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profª Dra Adelaide José Vaz
orientador/presidente

Profª Dra Irene da Silva Soares
1º. examinador

Profº Dr. José Antônio Jerez
2º. examinador

São Paulo, 07 de junho de 2006.

“Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende de nossa boa vontade e perseverança”.

Albert Einstein

Dedico esse trabalho aos que dele participaram, desde de quando era um sonho.

A Deus, por permitir que tudo acontecesse e abençoar os meus caminhos;
Aos meus pais Janice e José, exemplos de retidão e amor incondicional, por todo o apoio e
formação que me foram dados e o são até hoje;
As minhas irmãs Daniela e Juliana, pelo incentivo, companheirismo, amizade e amor;
A minha avó Maria, pelo apoio e exemplo de vida a ser seguido por todos nós;
A minha tia Celeste, pelo incentivo que eu nunca esqueci.

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª Dra Adelaide José Vaz, pela oportunidade que me foi dada, pelo exemplo de dedicação, orientação, profissionalismo e caráter;

A Prof^º Dra Kioko Takei, pelo estímulo constante e animador;

A Banca do Exame de Qualificação e de Defesa, Prof^ª Dra Irene da Silva Soares e Prof^º Dr. José Antônio Jerez, pelas correções e sugestões pertinentes, colaborando para o engrandecimento deste trabalho;

Ao Prof^º Dr. Antônio A. M. Maia, pelas amostras de soro de suínos dos animais infectados experimentalmente e dos animais que compuseram o grupo controle negativo;

Ao Prof^º Dr. Paulo Sérgio de Arruda Pinto, pelas amostras de soro de suínos com cisticercose;

A Prof^ª Dra. Regina Helena Saramago Peralta, pelas amostras de soro de suínos com cisticercose e amostras de soro de suínos provenientes de área endêmica do Piauí;

A Prof Dra Edneia Casagrandra Bueno, por preparar as membranas do IB LLGP;

Ao Dr. Victor C. W. Tsang, por ceder as membranas do IB LLGP;

A Profª Dra Maria Carmem de Arroyo Sanchez, pelo grande auxílio nas análises estatísticas;

Ao Dr Luis dos Ramos Machado e Dr Ronaldo Abraham, por permitirem o acompanhamento de pacientes com neurocisticercose, mudando minha visão sobre a doença, o que se tornou grande estímulo e motivação para a realização deste trabalho;

Aos meus amigos Noeli, Alberto, Simone, Cristiane, Edward, Alessandra, Silene, Elói, Rosa, Érika, Vanessa, Mayara e Ricardo que compartilharam tantos momentos, e juntos contribuíram para a realização desse trabalho;

Aos meus amigos Carolina e Bruno, pela amizade ímpar e sincera, pelo companheirismo e bom humor e pela solidariedade em todos os momentos dessa caminhada;

A FAPESP, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos Gerais	02
1.2. Epidemiologia	07
1.3. Aspectos Biológicos	10
1.4. Diagnóstico	12
1.4.1. Clínico	12
1.4.2. Laboratorial	13
1.4.2.1. Pesquisa de Anticorpos	13
1.4.2.2. Pesquisa de Antígenos	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Amostras de soro de suínos	20
3.1.1. Grupo de Suínos Infectados Experimentalmente com ovos de <i>T. solium</i>	20
3.1.2. Amostras Controle Positivo	22
3.1.3. Amostras Controle Negativo	22
3.2. Obtenção de Parasitas	23
3.2.1. Obtenção de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	23
3.3. Extratos Antigênicos	24
3.3.1. Líquido vesicular de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	24
3.3.2. Proteína 18/14 kDa (18/14 Tcra) obtida por imunoafinidade com anticorpos monoclonais a partir de LV-Tcra	25
3.4. Obtenção dos Anticorpos Monoclonais anti-antígeno de excreção e Secreção de <i>T. crassiceps</i> (anti-ES-Tcra)	26
3.5. Testes Imunológicos para Detecção de Antígenos Circulantes de cisticercos de <i>T. Solium</i>	27
3.5.1. ELISA Sanduíche	28
3.5.2. ELISA Direto	32
3.6. Detecção de Anticorpos da classe IgG anti-cisticercos de <i>T. solium</i>	34
3.6.1. Padronização de ELISA Indireto	34
3.6.2. Immunoblot	36
3.6.2.a. Immunoblot com Antígeno 18/14-Tcra	36
3.6.2.b. Immunoblot com Antígeno de <i>T. solium</i> purificado por cromatografia de afinidade utilizando coluna de lentil-lectina	37
3.7. Determinação do Limiar de Reatividade dos testes utilizando-se a curva ROC	38
3.8. Análise Estatística	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Infecção Experimental	43
4.2. Padronização	43
4.2.1. ELISA Sanduíche para pesquisa de antígenos	43
4.2.1.a. Estabelecimento da Quantidade Ideal de AcMo anti-ES-Tcra para Sensibilização da Placa utilizando Ag LV-Tcra	43
4.2.1.b. Verificação da Concentração Ideal de AcMo anti-ES-Tcra para Sensibilização da Placa utilizando Amostras Controle Positivo e Negativo	45
4.2.1.c. Análise do Tratamento Prévio das Amostras por TCA e Aquecimento	47

4.2.1.d. Curva Média com o Ag LV-Tcra.....	48
4.2.1.e. ELISA Sanduíche em Amostras Controle Positivo e Negativo.....	49
4.2.2. ELISA Direto para a pesquisa de Antígeno.....	51
4.2.2.a. Verificação da Diluição Ideal de AcMo anti-ES-Tcra.....	51
4.2.2.b. Titulação do conjugado anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase.....	52
4.2.2.c. Curva Média com o Ag LV-Tcra.....	53
4.2.2.d. ELISA Direto em Amostras Controle Positivo e Controle Negativo.....	54
4.2.3. ELISA Indireto para a Pesquisa de Anticorpos.....	56
4.2.3.a. Titulação em bloco do antígeno LV-Tcra e conjugado anti-IgG suína marcada com peroxidase.....	56
4.2.3.b. ELISA Indireto nas Amostras Controle Positivo e Controle Negativo.....	57
4.2.4. Imunoblot para Pesquisa de Ac utilizando IB 18/14.....	59
4.3. Pesquisa de Antígeno e Anticorpos no Grupo Infectado Experimentalmente.....	59
4.3.1. Pesquisa de Antígeno.....	59
4.3.1.a. ELISA Sanduíche.....	59
4.3.1.b. ELISA Direto.....	61
4.3.2. Pesquisa de Anticorpos.....	62
4.3.2.a. ELISA Indireto.....	62
4.3.2.b. Imunoblot.....	64
4.4. Parâmetros Sorológicos dos Testes para a Pesquisa de Antígeno e Anticorpo.....	68
4.5. Concordância entre os Testes para Pesquisa de Antígeno e Anticorpo.....	69
4.6. Algoritmo para Imunodiagnóstico da Cisticercose Suína na Triagem de Animais com Infecção Branda.....	70
5. DISCUSSÃO.....	72
5.1. Infecção Experimental.....	73
5.2. Padronização dos Imunoensaios.....	75
5.2.1. ELISA Sanduíche e ELISA Direto para a Pesquisa de Antígenos.....	76
5.2.2. ELISA Indireto para a Pesquisa de Ac.....	78
5.3. Pesquisa de Antígeno e Anticorpos no Grupo Infectado Experimentalmente (infecção branda).....	79
5.4. Análise da Concordância entre os Testes Sorológicos.....	82
5.5. Algoritmo para Imunodiagnóstico da Cisticercose Suína na Triagem de Animais com Infecção Branda.....	83
6. CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS.....	102

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1	Obtenção dos cisticercos de <i>T. crassiceps</i> 24
Figura 2	Representação esquemática do ELISA Sanduíche para pesquisa de antígenos circulantes de cisticerco de <i>T. solium</i> 31
Figura 3	Representação esquemática do ELISA Direto para de antígenos. circulantes de cisticerco de <i>T. solium</i> 34
Figura 4	Avaliação da quantidade de AcMo anti-ES-Tcra ideal para sensibilização das placas e análise da possível interação dos componentes do ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígeno 44
Figura 5	ELISA Sanduíche com diferentes concentrações de AcMo anti-ES-Tcra para sensibilização da placa 45
Figura 6	Representação linear das absorbâncias obtidas para as diferentes concentrações da curva de Ag LV-Tcra no ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígeno 46
Figura 7	ELISA Sanduíche para pesquisa de antígeno utilizando-se amostras controle positivo e negativo com diferentes tratamentos 47
Figura 8	Correlação linear da curva média de nove ensaios utilizando Ag-LVTcra no ELISA Sanduíche para pesquisa de antígeno 49
Figura 9	ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígeno nas amostras controle positivo e negativo 50
Figura 10	Absorbâncias obtidas para diferentes concentrações de AcMo anti-ES-Tcra no ELISA Direto para pesquisa de antígeno 52
Figura 11	Absorbâncias obtidas para diferentes concentrações do conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase no ELISA Direto pesquisa de antígeno 53
Figura 12	Correlação linear da curva média de dez ensaios utilizando Ag-LVTcra no ELISA Direto 54
Figura 13	ELISA Direto para a pesquisa de antígeno em amostras controle positivo e negativo 55
Figura 14	ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos em duas amostras de soro controle positivo e uma controle negativo 57
Figura 15	ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos em amostras de soro controle positivo e negativo 58
Figura 16	ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígeno nas amostras de soro dos animais do grupo cinética 60
Figura 17	ELISA Direto para a pesquisa de antígeno circulante nas amostras de soro dos animais do grupo cinética 61
Figura 18	ELISA Indireto para pesquisa de anticorpo anti-cisticerco de <i>T. solium</i> da classe IgG nas amostras de soro dos animais do grupo cinética 63
Figura 19	IB 18/14 das amostras de soro do suíno com 85 cisticercos nos diferentes tempos de coleta. 66
Figura 20	IB LLGP das amostras de soro do suíno com 85 cisticercos nos diferentes tempos de coleta 66

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Correlação entre os valores de área sob a curva obtidos pela aplicação da Curva ROC e sua interpretação em relação ao desempenho do teste em análise	39
Tabela 2	Correlação entre os possíveis valores de Índice Kappa obtidos e sua interpretação em relação à concordância entre testes	41
Tabela 3	Resultados referentes às amostras de soro dos suínos infectados experimentalmente correspondentes ao primeiro tempo ensaiado e a primeira reatividade encontrada para os IBs 18/14 e LLGP	65
Tabela 4	Resultados do IB 18/14 e IB LLGP para amostras de soro dos suínos infectados experimentalmente em diferentes tempos de coleta	68
Tabela 5	Resultados de sensibilidade, especificidade e intervalo de confiança (IC) nas amostras de soro de suínos do grupo controle positivo (C+) e controle negativo (C-), bem como a positividade encontrada no momento do abate (t140) para os soros dos animais infectados experimentalmente nos diferentes métodos: ELISA Sanduíche, ELISA Direto, ELISA Indireto, IB 18/14 e IB LLGP	69
Tabela 6	Porcentagem de positividade obtida com os soros dos suínos infectados experimentalmente referentes aos diferentes tempos de coleta, utilizando associação das diferentes metodologias para pesquisa de antígeno circulante e anticorpos IgG anti-cisticerco de <i>T. solium</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18/14-Tcra	Proteína 18/14 kDa obtida por imunoafinidade com anticorpos monoclonais a partir do antígeno LV-Tcra
Abs	Absorbância
ACF	Adjuvante Completo de Freund
Ac	Anticorpos
AcMo	Anticorpos Monoclonais
AcMo anti-ES-Tcra	Anticorpos Monoclonais anti-antígeno de excreção e secreção de <i>Taenia crassiceps</i>
Ag	Antígeno
Ag ES-Tcra	Antígeno de excreção e secreção de <i>Taenia crassiceps</i>
BSA	Albumina bovina sérica
C+	Amostra controle positivo
C-	Amostra controle negativo
DAB	Diaminobenzidina
ED	ELISA Direto
EI	ELISA Indireto
EITB	Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot
ES	ELISA Sanduíche
ES-Tcra	Antígeno de excreção e secreção de <i>Taenia crassiceps</i>
IB	Imunoblot
IC	Intervalo de Confiança
IR	Índice de Reatividade
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LLGP	Antígeno de <i>T. solium</i> purificado em coluna de lentil lectina
LV-Tcra	Líquido vesicular de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>
NC	Neurocisticercose
NR	Não reagente
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS Tween	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween a 0,05%
r^2	Coeficiente de Determinação
R	Reagente
SIF	Serviço de Inspeção Federal
t	Tempo (dias) após a infecção experimental com 200.000 ovos de <i>T. solium</i>
TCA	Ácido tricloroacético
T-Tso	Extrato total de <i>T. solium</i>
ug	µg (micrograma)
WHO	World Health Organization

RESUMO

GOMES, A.B. **Aplicação de imunoensaios para triagem da cisticercose suína em animais com baixa carga parasitária.** 2006.133 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Sete suínos com 2 meses de idade foram infectados experimentalmente com cerca de 200.000 ovos de *T. solium* administrados por via oral. Ao término do experimento (140 dias) os animais não apresentaram aspectos clínicos de cisticercose pelo exame de inspeção da língua; portanto eles poderiam ser classificados como animais saudáveis pelos exames usuais de inspeção utilizados em matadouros. Todos os animais foram sacrificados e a musculatura, cérebro e órgãos viscerais foram seccionados em finos pedaços para a procura de cistos. O número de cisticercos encontrados em cada animal variou de 1 a 85 (média 33,7 e desvio padrão 31,3), caracterizando-os como animais com infecção branda. Amostras de sangue dos animais infectados experimentalmente foram submetidas a imunoensaios para a pesquisa de anticorpos (ELISA Indireto, utilizando como antígeno o líquido vesicular de *Taenia crassiceps*; imunoblot 18/14, oriundo de antígeno de *Taenia crassiceps* purificado com anticorpos monoclonais e imunoblot LLGP, utilizando glicoproteínas de *T. solium* purificadas com lentil lectina) e para pesquisa de antígeno (ELISA Sanduíche e ELISA Direto, ambos utilizando o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra). O teste ELISA Direto não apresentou reatividade em qualquer amostra de soro dos diferentes animais infectados no momento do abate (t140). Foi encontrada positividade de 71% e 57%, respectivamente, para os testes ELISA Indireto para a pesquisa de anticorpos e ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígenos nestes tempos. Pelo imunoblot (IB) 18/14 e IB LLGP, respectivamente 5 (71%) e 6 (86%) dos animais infectados experimentalmente foram positivos no t140. O uso de ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos específicos (IB) somados ao ELISA Sanduíche para pesquisa de antígeno permitiu que todos os animais com infecção branda fossem detectados. Dessa forma, o uso de ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos e/ou antígenos mostrou-se mais útil que o exame clínico e/ou *post-mortem* para a triagem de cisticercose suína em animais com infecção branda.

Palavras-chave: cisticercose suína; antígenos; anticorpos; ELISA; Imunoblot

ABSTRACT

GOMES, A.B. **Application of immunoassays for swine cysticercosis screening in animals with low parasite burden.** 2006. 133 f. Dissertation (master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Seven 2-month-old swine were orally experimentally infected with approximately 200,000 eggs of *Taenia solium*. At the end of the experiment (140 days) the animals did not show clinical aspects of cysticercosis or parasites in tongue inspection; therefore they could be mistaken as healthy animals by usual inspection exams used in slaughterhouses. All of them were slaughtered and their whole muscles, brain and visceral organs were cut into thin slices searching for cysts. The number of cysts found in each animal varies from 1 to 85 (mean value 33.7 and standard deviation 31.3) characterizing them as slightly infected animals. Blood samples of experimentally infected animals were submitted to immunoassays for antibody detection (Indirect ELISA, using vesicular fluid antigen from *Taenia crassiceps*; immunoblot 18/14, from *T. crassiceps* antigen purified by monoclonal antibodies and immunoblot LLGP, using lentil lectin purified glycoproteins of *T. solium*) and for antigen detection (Sandwich ELISA and Direct ELISA, both using monoclonal antibodies anti-ES-Tcra). The Direct ELISA assay did not show any reactivity with all serum samples from the different animals at the slaughtered moment (t140). The positivity was 71% and 57% by the Indirect ELISA for searching antibodies and by the Sandwich ELISA for searching antigens, respectively. By immunoblot (IB) 18/14 and IB LLGP 5 (71%) and 6 (86%) experimentally infected animals were positive at t140, respectively. The use of immunoassays for detecting specific antibodies (IB) together with Sandwich ELISA for antigen detection allow the detection of all slightly infected animals. Thus, the use of immunoassays for antibodies and/or antigen detection showed they are more useful than usual clinical examination and/or tongue palpation for screening cysticercosis in slightly infected pigs.

Keywords: Swine cysticercosis, antigen; antibodies; ELISA; Immunoblot

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

A cisticercose em suínos foi descrita como doença por Aristófanos e Aristóteles no terceiro século a.C. (PESSOA; MARTINS, 1988), sendo creditado a Paronoli, em 1550, a primeira descrição da presença de algumas vesículas cheias de líquido no corpo caloso de um homem que morreu com crise convulsiva. Em 1558, foi descrito o caso de um indivíduo epilético no qual foram encontradas vesículas na dura-máter durante necrópsia (NIETO, 1982).

A cisticercose causada por *Taenia solium* é uma importante infecção parasitária que acomete seres humanos e suínos em muitos países em desenvolvimento na América Latina, África e Ásia (WHO, 2002; PHIRI et al., 2003; RAJSHKHAR, 2003, ZOLI et al., 2003). Sendo uma das zoonoses mais graves causadas por cestóides, mesmo em comunidades muçulmanas e judaicas, nas quais o consumo de carne suína é proibido por fatores religiosos (SCHANTZ et al., 1992, 1993; CRAIG; ROGAN; ALLAN, 1996; SIMANJUNTAK et al., 1997; CRAIG; PAWLOWSKI, 2002). Outros países em desenvolvimento já apresentaram a preocupação com o complexo teníase/cisticercose, como Indonésia (WANDRA et al., 2005), Venezuela (MEZA et al., 2005), Peru (HUISA et al., 2005) e Bolívia (NICOLETTI et al., 2005). O complexo teníase/cisticercose desapareceu em muitos países europeus há cerca de um século, graças ao desenvolvimento de sistemas de saneamento básico e de programas de prevenção de doenças parasitárias, além da implementação de medidas de controle na inspeção das carcaças dos suínos (revisto por CARPIO, 2002; revisto por FLISSER et al., 2003).

O ciclo de vida da *T. solium* tem como hospedeiro intermediário os suínos, os quais albergam a forma larvária conhecida como cisticerco (NASH; NEVA, 1984; revisto por GONZALEZ et al., 2003). O contato dos suínos com fezes contaminadas contendo ovos ou proglotes inteiras de *T. solium*, bem como o consumo por seres humanos de carne suína contaminada mal cozida, além da comercialização de carne suína não inspecionada são fatores que promovem e mantêm a transmissão da doença (SARTI et al., 1988; GARCIA et al., 1991; FLISSER et al., 1994). Sendo assim, suínos infectados com cisticercose têm um papel fundamental na transmissão e manutenção do complexo teníase/cisticercose, com necessidade de serviços efetivos para controle de animais saudáveis e inspeção da carne a ser comercializada (CARRADA-BRAVO, 1987; FLISSER, 1991).

A WHO sugeriu que o controle do complexo teníase/cisticercose seria bem sucedido caso houvesse a instalação e fiscalização rigorosa de programas de inspeção da carne suína em matadouros, somados a sistemas de melhoria de saneamento básico e educação sanitária. Esta estratégia não obteve sucesso em países em desenvolvimento, em parte devido à confiscação dos animais infectados nos matadouros sem pagamento aos criadores dos mesmos, estimulando um mercado clandestino de comercialização da carne não fiscalizada, propiciando a manutenção dessa zoonose nestes países (revisto por GONZALEZ et al., 2003). No Peru, cerca de 55% dos suínos são abatidos ilegalmente e esse quadro chega a cerca de 100% em áreas rurais (CWGP, 1993).

A inspeção de carne suína em matadouros constitui, portanto, importante mecanismo preventivo de controle da teníase humana e, por sua vez, da cisticercose suína e humana, reduzindo o consumo de carne contaminada com cisticercos e

contribuindo com a vigilância epidemiológica da doença, pela notificação dos casos aos serviços de Saúde Pública e Animal, segundo a sua procedência (MACIEL; PAIM, 1966; ARRUDA; CAMARGO; COELHO, 1990). Vale salientar que a inspeção de carnes para consumo humano reduz o risco de transmissão principalmente nos casos de animais criados clandestinamente e com infecção maciça, apresentando cerca de 70% de sensibilidade (PHIRI et al., 2002; NGOWI et al., 2004); enquanto que a inspeção de animais com baixa carga parasitária pode ser menos eficiente, uma vez que para um exame *post-mortem* detalhado haveria perda comercial da carne (revisto por GONZALEZ et al., 2003; PINTO et al., 2000).

Muitos autores concordam que suínos com infecção branda, ou seja, com baixa carga parasitária, podem passar despercebidos pela inspeção da carne, mantendo, dessa forma, o ciclo e transmissão do parasita (NUNES et al., 2000; SCIUTTO et al., 1998). Observa-se que nos países onde o consumo de carne suína infectada é elevado, as prevalências de teníase e cisticercose humana são altas (ARRUDA; CAMARGO; COELHO, 1990).

No Brasil, segundo Villa (1995), o Serviço de Inspeção Federal (SIF) controla cerca de 49% da carne comercializada no país, sendo desconhecidos os dados de inspeções estaduais e municipais e dos matadouros clandestinos, que funcionam sem qualquer controle sanitário. Mesmo nos serviços controlados, a ocorrência de casos pode ficar mascarada em consequência de falhas técnicas e de infra-estrutura, além da necessidade de se evitar perda comercial da carne, devido a suas desfigurações excessivas por corte durante o exame *post-mortem* (VILLA, 1995). Sato et al. (2003) defendem a implementação de métodos mais eficientes, com maior sensibilidade, possibilitando melhor triagem dos animais. Como metodologia extra no processo de

triagem da carne animal poderiam ser adotados métodos de imunodiagnóstico, como o ELISA para a pesquisa de antígenos e/ou anticorpos circulantes.

O regulamento do SIF (BRASIL, 1980) em seus artigos 176 e 204, prevê a condenação total de carcaças com contaminação intensa e rejeição parcial das partes contaminadas, seguida de tratamentos pelo frio, calor ou salga das partes aparentemente sadias, nos casos de contaminação discreta ou moderada. Hoje tem sido rotina o emprego do congelamento de carcaças contaminadas em estabelecimentos inspecionados pelo SIF. Na França é considerada contaminação intensa a presença de mais de um cisticerco por 10 cm²; nos Estados Unidos, Alemanha e Austrália mais de dois por 20 cm² e no Brasil um ou mais cisticercos em área equivalente à palma da mão (CÔRTEZ, 1984). Onah; Chiejina (1995) consideram a presença de cisticercos em três ou mais superfícies do exame como generalizada e localizada quando encontrados em um ou dois locais.

Algumas estratégias foram propostas para o controle da cisticercose através do tratamento farmacológico em massa da população humana (DIAZ-CAMACHO et al., 1991; ALLAN et al., 1997; SARTI et al., 2000), baseando-se na suposição de que com a eliminação dos ovos no meio ambiente, o ciclo de transmissão da doença seria quebrado. Porém, existe também o risco teórico do aumento da cisticercose humana durante o tratamento em massa, caso as condições sanitárias permitam a disseminação das fezes contaminadas com ovos no meio ambiente (GILMAN et al., 1999). Estudos realizados em uma comunidade no México demonstraram que houve um aumento da prevalência da cisticercose suína de 6,6 para 11% após um ano do tratamento em massa em humanos (KEILBACH; de ALUJA; SARTI-GUTIERREZ, 1989).

A identificação da teníase é importante devido ao risco da manutenção do complexo teníase/cisticercose. Garcia et al. (2003) relataram que 22 a 34% dos pacientes com neurocisticercose (NC) apresentavam antecedentes de teníase familiar. Vale salientar que a positividade do exame coproparasitológico é baixa (AGAPEGEV, 2003), já que as técnicas empregadas para detecção de proglotes ou ovos de *Taenia sp.* em material fecal humano possuem baixa sensibilidade e especificidade (PAWLOWSKI; SCHULTZ, 1972) e que a liberação das proglotes grávidas, é intermitente, levando a uma subestimação da prevalência da teníase (ALLAN et al., 1996a). O diagnóstico específico da *Taenia solium* caracteriza-se pelo processo de tamisação das fezes, seguido de método que permita a análise do número e tipo de ramificações uterinas presentes nas proglotes grávidas expulsas nas fezes dos hospedeiros parasitados (REY, 1991). Muitos estudos tentam criar alternativas para a detecção das tênias, Allan et al. (1990) relatam 90% de sensibilidade em ELISA para pesquisa de antígenos de *Taenia sp.* em amostras fecais (coproantígenos), possibilitando positividade de pelo menos 2,6 vezes maior que a microscopia convencional (ALLAN et al., 1996b), sendo foi relatada especificidade acima de 98% para a detecção de coproantígenos (revisto por ALLAN; CRAIG, 2006). Já utilizando técnicas moleculares, com estudo de seqüências repetitivas de DNA Chapman et al. (1995) descreveram a possibilidade de distinção entre *T. solium* e *T. saginata*.

O complexo teníase/cisticercose é passível de erradicação, já que: possui como hospedeiro definitivo somente o ser humano; há a possibilidade potencial de controle da cisticercose suína; não existem hospedeiros selvagens para o parasita em questão e há medicamentos eficazes contra cisticercos e ovos de *Taenia solium* (revisto por FLISSER et al., 2003). Apesar disso, há a necessidade da implantação efetiva de

saneamento básico, controle da água e inspeção de carne suína. Dessa forma, a implementação de alternativas viáveis para a erradicação da parasitose não é tão simples, pois esbarra em problemas sociais, políticos, econômicos e até mesmo de controle de imigração (revisto por GONZALEZ et al., 2003).

1.2. 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 de 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 (WHO, 1993).

A cisticercose suína representa uma das mais importantes restrições ao crescimento das criações de suínos para comercialização em países em desenvolvimento, afetando, portanto, aspectos econômicos e nutricionais. A presença de cisticercos pode acarretar em importante impacto econômico devido à condenação da carne (PHIRI et al., 2002). A população suína mundial é estimada em 923 milhões, destes, 552 milhões são encontrados na Ásia, 72 milhões na América do Norte, 194 milhões na Europa, 81 milhões nas Américas do Sul e Central e 18 milhões na África. Levando em consideração diferentes países, as estimativas indicam que a população suína é de cerca de 454 milhões na China, 59 milhões nos Estados Unidos da América,

20 milhões no Vietnã, 17 milhões na Índia, 10 milhões no Japão, 5 milhões na Nigéria e 0,5 milhões na Tanzânia (FAOSTAT, 2002; revisto por LEKULE; KYVSGAARD, 2003).

Muitos autores relatam informações epidemiológicas da cisticercose suína baseadas nos achados dos exames de apalpação da língua e *post-mortem*, que resultaram em altas taxas de prevalência nos países que apresentavam suínos com infecção maciça, nos quais a cisticercose é considerada um problema de saúde pública, como: Brasil, Colômbia, México e Peru (SCHENONE et al., 1982; CHIMELLI; LOVALHO; TAKAYANAGUI, 1998; FLISSER, 2002). Estudos adicionais relataram a presença de *T. solium* em outros países como, por exemplo, a Guatemala (ALLAN et al., 1996a).

Os estudos epidemiológicos vêm sendo facilitados pelo desenvolvimento de ensaios sorológicos para pesquisa de anticorpos no soro de suínos e humanos (FLISSER et al., 2003). Gonzalez et al. (1990) relatam que a prevalência encontrada em Huancayo (Peru), foi de 23,4% realizando a inspeção por apalpação das línguas dos animais, 31,2% pelo *post-mortem*, 37,7% por ELISA e 51,9% pelo imunoblot. Sarti et al. (1988, 1994a, 1994b, 1997, 2000) realizaram estudos epidemiológicos no México e relataram percentual de cisticercose suína de 35% em El Sotano, 4% em Agangeo, 6,5% em Xoxocota, 2,5% em Chalcatzingo e 1% em Atotonilco através do exame de apalpação da língua dos animais.

Estudos relatam que a cisticercose em suínos e humanos causada por *T. solium* tem ampla distribuição na África (GEERTS et al., 2002; PHIRI et al., 2002). Entretanto, dados precisos sobre a prevalência e importância dessa doença na África do Sul são escassos. Phiri et al. (2002) examinaram 1.316 suínos provenientes da Zâmbia, dos quais 8,2% (criados na região Sudeste) e 5,2% (criados na região Leste) foram

positivos pela inspeção através da apalpação da língua. Usando ELISA para pesquisa de antígenos 20,8% e 9,3% desses animais, respectivamente, foram reagentes.

Sakai et al. (2001) ao analisarem por EITB (Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot) soros de suínos criados livremente em 3 regiões do estado da Bahia (Brasil) observaram prevalência de anticorpos anti-*T. solium* em 4,4% dos animais de Salvador, 3,2% dos de Santo Amaro e 23,5% dos de Jequié. No Brasil, os estados considerados como endêmicos para cisticercose são: São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo e Goiás, sendo ocasionais os casos relatados nos estados da Bahia, Maranhão, Pernambuco, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte (RAMOS et al., 2004). Porém, os demais estados ainda não podem ser vistos como regiões de baixa ocorrência, pelos seguintes motivos: o complexo teníase/cisticercose não possui notificação compulsória; há falta de estudos mais apurados no território nacional e a complexidade do diagnóstico tanto em suínos quanto em humanos. (SILVA-VERGARA et al., 1994).

Estudos da cisticercose humana no Brasil estão restritos a Centros de Especialização Neurológica, e apontam para a frequência da NC, que varia de 1,6% a 7,5% dos pacientes internados com distúrbios neurológicos, tendo como causa a presença de cisticercos no Sistema Nervoso Central (TAKAYANAGUI; JARDIM, 1983; SPINA-FRANÇA; LIVRAMENTO; MACHADO, 1993). A cidade pioneira em estudos de notificação compulsória para cisticercose foi Ribeirão Preto, São Paulo; segundo Takayanagui et al. (1996), a prevalência de 1992-1995 foi de 54 casos/100.000 habitantes, destes 21% apresentavam a forma ativa da doença. Sendo assim, pode-se observar que os dados referentes ao território nacional ainda são subestimados.

Dados demonstram que a NC é uma doença emergente em países

desenvolvidos, como os Estados Unidos da América: em Los Angeles 138 casos de NC foram detectados entre 1988 e 1990; destes 85% ocorreram em indivíduos nascidos de imigrantes, 7% em indivíduos que haviam viajado para áreas endêmicas e 8% dos casos foram adquiridos localmente (SCHANTZ; WILKINS, TSANG, 1999).

1.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS

O parasito pertence ao filo *Platyhelminthes* (verme chato), classe *Cestoidea* (hermafrodita, desprovido de tubo digestivo, corpo achatado dorsoventralmente em forma de fita, composto de segmentos gerados a partir do escólex), ordem *Cyclophyllidea* (um único hospedeiro intermediário e oncosfera protegida por embrióforo não ciliado), família *Taeniidae* (escólex, útero em forma de tubo longitudinal mediano com ramificações laterais e poros genitais alternos), gênero *Taenia* e espécie *T. solium* (REY, 2001).

A *T. solium*, na fase adulta, tem como único hospedeiro o homem, e a doença que produz chama-se teníase, passando a eliminar ovos ou até mesmo proglotes inteiras nas fezes. O suíno, ingerindo ovos viáveis do parasita, irá propiciar condições ideais para que o embrião hexacanto, ou oncosfera, se desenvolva em seus tecidos até a forma larvária da *T. solium*. Quando os seres humanos ingerem carne suína mal cozida contaminada com cisticercos de *T. solium* eles desenvolvem a forma adulta no intestino delgado, doença conhecida como teníase (REY, 2001). Acidentalmente, seres humanos adquirem a cisticercose através de contaminação oral com os ovos de *T. solium* excretados nas fezes de indivíduos com a forma adulta do parasita no trato intestinal. A larva migra pelo corpo via circulação sanguínea, invadindo os músculos

esqueléticos, tecidos subcutâneos, ou SNC (VAZ; LIVRAMENTO, 2001). A cisticercose constitui a forma mais grave de parasitismo humano por helmintos devido às localizações preferenciais dos cisticercos no sistema nervoso central e globo ocular (REY, 2001).

Apenas a *T. solium* tem sido associada ao complexo teníase/cisticercose no ser humano, embora esporadicamente o parasita possa estar presente em outros hospedeiros intermediários, como em ursos negros (*Ursus americanus*) descrito por Theis et al. (1996). Também foi relatado um caso de cisticercose humana causada por *T. crassiceps* em paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida (CHERMETTE et al., 1995).

O cisticerco de *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, 1988). O líquido vesicular 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 (RAMIREZ-BON et al., 1982).

O envoltório do ovo de *Taenia solium* se desintegra no sistema digestivo do suíno, liberando o embrião hexacanto, que penetra ativamente na mucosa intestinal e chega a circulação, podendo se alojar em diferentes tecidos (Flisser et al., 1991). O desenvolvimento pleno dos cisticercos leva cerca de 60 dias após a ingestão dos ovos (FLISSER, 1991; revisto por CARPIO, 2002). Nos suínos, os cisticercos usualmente

não causam danos apreciáveis, as larvas se fixam no tecido conjuntivo intermuscular onde são envolvidas por uma cápsula adventícia, formada pela reação do organismo do hospedeiro (FREITAS, 1980).

1.4. DIAGNÓSTICO

1.4.1. Clínico

Usualmente para o diagnóstico da cisticercose suína são realizados o exame de inspeção na língua e o exame *post-mortem* (necropsia). O exame *post-mortem* consiste na procura de cisticercos em diferentes locais das carcaças, considerados preferenciais para a instalação do parasita. São eles: coração, diafragma, músculos mastigadores (masseter externo e pterigóide), língua, pescoço, músculos intercostais e abdominais (BOA et al., 2002). O exame da língua é pouco sensível (70%), embora apresente elevada especificidade (100%), já que a localização do parasita pode não ser disseminada (WHO, 1993).

Boa et al. (2002) analisaram tecidos de suínos naturalmente infectados provenientes de localidades da Tanzânia a fim de determinar a distribuição e 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 masseter interno, 7,1% no masseter externo, 4,9% no tríceps braquial e 3,4% na língua. Do total, apenas 18,6% dos cisticercos encontrados estavam nos músculos preconizados como locais de inspeção (músculos masseter e língua).

Apesar da importância dos procedimentos usuais de inspeção da carne, existem deficiências, principalmente em infecções leves, podendo passar despercebidos 40 a 50 % dos casos de cisticercose suína (CÔRTEZ, 1984), justificando o emprego de testes específicos para o seu diagnóstico.

1.4.2. Laboratorial

1.4.2.1. Pesquisa de Anticorpos

Vários autores têm usado ELISA e imunoblot (IB) com antígenos provenientes de cisticercos de *T. solium* (GONZALEZ et al., 1990; PATHAK et al., 1994; ALUJA et al., 1996; SCIUTTO et al., 1998) para a detecção de anticorpos na cisticercose suína com sensibilidade superior a 70% para o ELISA e 90% para o IB, e com a especificidade superior a 73% para o ELISA e de 100% para o IB, demonstrando as vantagens do IB.

Diversos antígenos vêm sendo utilizados em testes sorológicos. Rodriguez–Canul et al. (1998) utilizaram extrato salino de metacestóides de *T. solium* em IB para detecção de cisticercose suína, com melhor desempenho do IB LLGP com o antígeno de *T. solium* purificado por cromatografia de afinidade utilizando coluna de lentil-lectina (TSANG; BRAND; BOYER, 1989). Nunes et al. (2000) compararam a utilização dos antígenos de líquido vesicular e de extrato bruto de *T. solium* e *T. crassiceps* por ELISA para pesquisa de anticorpos em 28 amostras de soro de animais infectados naturalmente, com melhor sensibilidade para o líquido vesicular de *T. crassiceps* e melhor especificidade para o líquido vesicular de *T. solium*. Verastegui et al. (2003) trabalharam com o reconhecimento dos antígenos provenientes da oncosfera de *T.*

solium e *T. saginata* por IB, sendo encontrada reatividade nas amostras de soro de 93% dos suínos com infecção maciça e 61% com infecção branda.

Pinto et al. (2000) relataram melhor desempenho do teste ELISA para pesquisa de anticorpos em soro de suínos com cisticercose utilizando líquido vesicular de cisticerco de *T. crassiceps* como antígeno, com sensibilidade de 96% e especificidade de 97,5%. Os outros antígenos testados foram escólex e extrato bruto de *T. solium* e de *T. crassiceps*.

Ao utilizar IB em soro de suínos, Gonzalez et al. (1990) obtiveram 30% de reações falso-positivas em soros de animais procedentes de regiões endêmicas. Essa reatividade pode ser atribuída a reações cruzadas com outras parasitoses comuns em animais criados em condições sanitárias deficientes, como *Taenia hidatigena*, *Echinococcus granulosus* e *Fasciola hepatica*, além de anticorpos específicos em suínos que tiveram contato com o parasita, porém sem o estabelecimento da infecção. Os autores relatam que os exames *post-mortem* em suínos apresentaram sensibilidade de 70% e que testes imunoenzimáticos utilizando antígeno total de cisticerco de *T. solium* apresentaram sensibilidade de 79,4%.

Sato et al. (2003) encontraram 34% de positividade para anticorpos por ELISA em suínos com inspeção negativa da língua, dos quais 18% foram confirmados no imunoblot. A detecção dos anticorpos se deu a partir de 30 dias após a infecção experimental em suínos que apresentavam 16 ou mais cisticercos.

Alguns autores recomendam a utilização de antígeno larvário de *T. crassiceps* para o diagnóstico da cisticercose humana (LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1997b), bem como da cisticercose suína (BIONDI et al., 1996; PINTO et al., 2000; NUNES et al., 2000), especialmente pela dificuldade da obtenção de cisticercos de *T. solium* de

animais infectados naturalmente. Alguns trabalhos revelam maior sensibilidade e especificidade usando o líquido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* (LV-Tcra) quando comparado com o extrato bruto não purificado de *T. solium* (GONZALEZ et al., 1990; PATHAK et al., 1994; PINTO et al., 2000; NUNES et al., 2000).

1.4.2.2. Pesquisa de Antígenos

Muitos trabalhos relatam boa eficiência da pesquisa de antígenos de cisticercos em LCR de pacientes com NC (CHANG-YUAN; HONG-HUA; LING-YUN, 1992; DIAZ et al., 1992; GARCIA; DEL BRUTO, 2000; PARDINI et al., 2001), entretanto o uso de amostras de soro introduz vários componentes circulantes que podem interferir no ensaio, tornando-o menos reprodutível. Ainda assim há relatos de razoável eficiência da pesquisa de Ag em soro de suínos. A maioria deles utiliza grupos de estudo com infecção maciça, sendo parte deles com inspeção na língua e *post-mortem* positivos (SCIUTTO et al., 1998; NGUEKAM et al., 2003; SATO et al., 2003; RODRÍGUEZ-HIDALGO et al., 2003).

Segundo Verastegui et al. (2000), poucos trabalhos com animais infectados experimentalmente foram publicados, entre outros motivos, devido às baixas taxas de infecção obtidas, salientando o fato de que a obtenção de proglotes grávidas com ovos intactos é bastante difícil, em parte devido ao rompimento das estruturas após o tratamento dos seres humanos com teníase.

Nguekam et al. (2003) foram capazes de detectar antígeno circulante por ELISA em animais infectados experimentalmente, portando no mínimo 16 cisticercos, entre 2 a 6 semanas após a infecção experimental até o término do estudo. Adicionalmente,

estes autores relatam alta flutuação na pesquisa de antígeno em animais com número de cisticercos inferior a 100. Sciutto et al. (1998) demonstraram que em animais infectados maciçamente, antígenos e anticorpos foram detectados de 29 até 200 dias após a infecção, enquanto que em suínos com infecção branda, antígenos e anticorpos foram inicialmente observados entre 61-97 dias após a infecção, utilizando ELISA para pesquisa de antígeno com 83,7% de sensibilidade e 95,7% de especificidade.

Testes de triagem detectando anticorpos e antígenos podem ser úteis numa etapa anterior ao abate, discriminando os animais não infectados daqueles com possível infecção, além de constituírem interessante ferramenta para os estudos epidemiológicos; principalmente em suínos com infecção branda, os quais possuem importante papel na manutenção do complexo teníase/cisticercose.

2. OBJETIVOS

Visando contribuir para os estudos de diagnóstico da cisticercose suína, objetivamos neste trabalho a utilização de testes imunológicos para detecção de antígenos e anticorpos circulantes em soro de suínos com infecção branda (animais infectados experimentalmente), bem como a comparação dos resultados obtidos com os exames utilizados rotineiramente na triagem da carne suína (apalpação da língua e *post-mortem*).

1. Padronização e aplicação de Imunoensaios para pesquisa de antígenos circulantes (ELISA Sanduíche e Direto);
2. Aplicação de Imunoensaios para pesquisa de anticorpos utilizando líquido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* (ELISA Indireto e IB 18/14), bem como glicoproteínas purificadas de cisticercos de *Taenia solium* (IB LLGP);
3. Avaliação da eficiência da associação de testes (algoritmos), utilizando imunoensaios para a triagem da cisticercose suína.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho faz parte do projeto temático Cisticercose: Imunodiagnóstico, Antígenos, Resposta Imunológica e Aspectos Clínico-Epidemiológicos, número FAPESP 2002/12061-0, desenvolvido no laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP em colaboração com as seguintes instituições: Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, SP; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, Ribeirão Preto, SP; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC; Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos USP, Pirassununga, SP.

Foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais FCF/USP 13/2003.

3. 1. AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS

3.1.1. Grupo de Suínos infectados experimentalmente com ovos de *T. solium*

Amostras de soro de sete animais infectados experimentalmente com ovos de *Taenia solium* foram cedidas gentilmente pelo Profº Dr. Antônio A. M. Maia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP), em Pirassununga, SP.

As proglotes grávidas de *T. solium* foram obtidas de paciente acometido por teníase, após o tratamento com 2 g de niclosamida (Yomesan, Bayer) e administração de salina. As proglotes grávidas foram lavadas cuidadosamente e guardadas em solução salina com antibióticos a 4°C durante 28 dias.

Sete suínos da raça Landrace com 2 meses de idade foram criados em condições sanitárias controladas na fazenda experimental da FZEA-USP, excluindo a

possibilidade do encontro acidental com ovos do parasita no meio ambiente. Os animais foram infectados experimentalmente com cerca de 200.000 ovos de *T. solium* administrados por via oral. A padronização do inóculo foi realizada em câmara de Neubauer. Amostras de sangue foram colhidas utilizando-se a jugular, sendo colhida uma amostra de cada animal no período que antecedeu a infecção experimental (t₀) e, após a infecção experimental, em períodos que variaram de uma a duas semanas durante 140 dias. Após centrifugação, os soros obtidos foram armazenados a -20°C.

A partir do 40º dia após a infecção experimental foram realizados exames de inspeção na língua dos animais por apalpação para procura de cistos a cada sete dias. Vale ressaltar que o tempo mínimo para que os cisticercos se desenvolvam a ponto de serem perceptíveis na apalpação gira em torno de 60 dias após a infecção (ESCOBAR; NIETO, 1972; PESSOA; MARTINS, 1988). Em todas as inspeções realizadas não foram observados cisticercos.

Ao término do experimento, os animais foram sacrificados e a musculatura, cérebro e órgãos viscerais foram cortados em pedaços de aproximadamente 0,5 cm para a procura de cistos. O total de cisticercos encontrado nos suínos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 foi, respectivamente, 60, 1, 6, 11, 26, 85 e 47.

A eficiência da infecção experimental foi calculada pela razão entre o número de cisticercos encontrados em cada animal (através da realização do exame *post-mortem*) e o número total de ovos de *T. solium* administrados (200.000 ovos).

Para facilitar a forma de expressão dos resultados a letra “t” foi utilizada anteriormente a um número, o qual se tratava do dia da coleta. Por exemplo, a amostra de soro colhida no 42º dia após a infecção experimental foi expressa como amostra de soro no t₄₂.

3.1.2. Amostras Controle Positivo

Como controles positivos nas reações de padronização foram utilizadas duas amostras de soros de suínos com cisticercose confirmada pelo encontro de cisticercos na carne dos animais, cedidas pelo Profº Dr. Paulo Sérgio de Arruda Pinto do Departamento de Veterinária da Faculdade de Viçosa, Minas Gerais. As amostras foram obtidas em 1997 e mantidas em alíquotas a -20°C desde então.

Ainda como controle positivo foram utilizados duas amostras de soros de suínos com diagnóstico de cisticercose confirmado pelo encontro de cistos na língua e músculos na realização do exame post-mortem e 10 amostras de soro de suínos com pesquisa de anticorpos por ELISA positiva para cisticercose e confirmada posteriormente em nosso laboratório através do imunoblot. Todas as amostras eram provenientes de área endêmica do Piauí fornecidas pela Profª Dra. Regina Helena Saramago Peralta, da Universidade Federal Fluminense, RJ.

3.1.3. Amostras Controle Negativo

As amostras Controle Negativo utilizadas foram soros de suínos criados em condições de higiene controladas no campus da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, em Pirassununga e que não apresentaram afecção clinicamente detectável, totalizando 15 amostras, cedidas pelo Profº Dr. Antônio A. M. Maia.

3.2. OBTENÇÃO DE PARASITAS

3.2.1. Obtenção de cisticercos de *Taenia crassiceps*

Foi estudado o antígeno obtido a partir da forma larvária de *T. crassiceps*, cepa ORF - Ontario Research Fundation, Canadá (FREEMAN, 1962), cedida 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 μ L) de solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M pH 7,2 (PBS). A inoculação foi feita com o auxílio de agulha hipodérmica de calibre 25 x 7 mm.

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

Os cisticercos de *T. crassiceps* obtidos pela inoculação intraperitoneal em camundongos BALB/c fêmeas para a obtenção dos antígenos estão representados na Figura 1.

Figura 1. Obtenção dos cisticercos de *T. crassiceps*, sendo A: Camundongo fêmea BALB/c contendo os cisticercos de *T. crassiceps* intraperitonealmente; B: Retirada dos cisticercos; C: cisticercos obtidos.

3.3. EXTRATOS ANTIGÊNICOS

3.3.1. Líquido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* (LV-Tcra)

Os cisticercos íntegros foram rompidos com auxílio de bastão de vidro e centrifugados a 15.000 g, durante 10 minutos a 4°C. Após centrifugação foi retirado o

sobrenadante e estocado. O sobrenadante foi reunido e submetido ao tratamento por ultra-som (Ultrasonic Power Unit – MSE, EUA) em 4 ciclos de 30 segundos a 1mA e 20kHz, em banho de gelo. A mistura foi centrifugada duas vezes a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C e o último sobrenadante constituiu o 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).

O antígeno LV-Tcra foi dosado pelo método descrito por Lowry et al. (1951), utilizando albumina bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) como padrão.

3.3.2. Proteína 18/14 kDa (18/14-Tcra) obtida por Imunoafinidade com Anticorpos Monoclonais a partir de LV-Tcra

O antígeno LV-Tcra obtido segundo procedimento descrito foi processado em coluna de afinidade com anticorpos monoclonais (AcMo) anti- LV-Tcra. O volume aplicado foi de 10 mL de LV-Tcra com concentração de 1,4mg/mL (total de 14,0 mg). O antígeno resultante da purificação foi nomeado proteína 18/14-Tcra. (ESPÍNDOLA et al., 2005).

O anticorpo monoclonal anti-LV-Tcra foi obtido segundo Espíndola et al. (2002). Os anticorpos monoclonais anti-LV-Tcra foram testados em imunoblot na concentração de 1,7 µg/mL frente a diferentes antígenos para o estudo de especificidade. Os antígenos utilizados foram o LV-Tcra, extrato total de *T. solium* (T-Tso), líquido vesicular de *T. solium*, membrana de *T. solium*, escólex de *T. solium*, escólex e membrana de *T.*

saginata e extrato total de *T. saginata*. Foi verificada reatividade com frações menores que 20 kDa com todos os antígenos estudados (ESPÍNDOLA, 2004).

A proteína 18/14-Tcra foi dosada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) como padrão.

3.4. OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ANTÍGENO DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO DE *T. crassiceps* (anti-ES-Tcra)

Aproximadamente 900 larvas de *T. crassiceps* foram cultivadas em garrafas de plástico estéreis contendo 20 mL de PFHM-protein-free hybridoma medium (Gibco, Grand Island, NY), suplementado com os antibióticos penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) e fungizone a 2,5 µg/mL (Gibco). As garrafas foram incubadas a 37°C em estufas de CO₂ a 5%. Após 48 horas, o meio de cultura foi colhido e concentrado utilizando-se membrana YM-1 (Amicon, Beverly, MA) constituindo o antígeno de excreção e secreção de *T. crassiceps* (ES-Tcra) (ESPÍNDOLA et al., 2002).

A dosagem protéica do antígeno ES-Tcra foi realizada por micro BCA protein assay (Pierce Chem. Com., Rockford, EUA). Os anticorpos monoclonais anti-ES-Tcra foram obtidos segundo Espíndola et al. (2002).

Um grupo de 4 camundongos BALB/c foi imunizado pela via subplantar com 10µg de antígeno ES-Tcra em 15µL de salina e emulsificado na mesma proporção em adjuvante completo de Freund (ACF). Após 19 dias os animais receberam uma dose reforço. Os camundongos foram sangrados pelo plexo oftálmico. A cinética da produção

dos anticorpos foi verificada por ELISA para reatividade específica com antígeno LV-Tcra e cruzada com o T-Tso. Os anticorpos também foram ensaiados por imunoblot. Cerca de 10 dias após a aplicação da dose booster, foi possível proceder à retirada dos linfonodos dos animais imunizados.

Os hibridomas foram obtidos com células de mieloma SP2-O e a fusão celular foi realizada de acordo com Köhler; Milstein (1975), com algumas modificações.

A seleção dos clones por ELISA foi iniciada dez dias após a fusão celular, quando os hibridomas já apresentavam bom crescimento celular. O teste ELISA para a seleção dos clones foi realizado com antígenos T-Tso e LV-Tcra.

Para o estudo da reatividade e especificidade dos anticorpos foram utilizados diferentes antígenos em imunoblot com os AcMo anti-ES-Tcra a 1:1.000. Os antígenos utilizados foram o de LV-Tcra, T-Tso, líquido vesicular de *T. solium*, membrana de *T. solium*, escólex de *T. solium*, escólex e membrana de *T. saginata* e extrato total de *T. saginata*. Verificamos que houve reatividade com frações menores que 20 kDa com todos os antígenos estudados, sugerindo homologia dessas frações nos diferentes extratos antigênicos e justificando o uso deste AcMo para a pesquisa de antígenos circulantes de cisticercos de *T. solium* (ESPÍNDOLA, 2004).

3.5. TESTES IMUNOLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS CIRCULANTES DE CISTICERCOS DE *T. solium*

Avaliações quanto às condições dos ensaios, tempo, temperatura, título adequado de reagentes e diluentes foram realizadas. Os reagentes e soluções utilizadas estão contidos no ANEXO I. Foram desenvolvidos dois ensaios ELISA para

pesquisa de antígeno, ambos utilizaram anticorpos monoclonais anti-ES-Tcra. No ELISA Sanduíche foi utilizado AcMo anti-ES-Tcra para a sensibilização da placa e AcMo anti-ES-Tcra biotinilado após a incubação da amostra. O conjugado utilizado para revelar a reação foi avidina-peroxidase (Sigma Chem. Co., EUA). No ELISA Direto foram utilizadas amostras de soros de animais saudáveis e com cisticercose para a sensibilização das placas seguidas de AcMo anti-ES-Tcra a fim da ligação do mesmo com os peptídeos presentes no antígeno de cisticerco de *T solium*, o conjugado utilizado foi anti-IgG de camundongo-peroxidase (Sigma Chem. Co., EUA).

3.5.1. ELISA Sanduíche

A fim da padronização do ELISA Sanduíche utilizando AcMo anti-ES-Tcra para a pesquisa de antígeno circulante em soro de suínos portadores de cisticercose, foram realizados vários estudos para obtenção das melhores condições da reação.

Para o estabelecimento da quantidade ideal de AcMo anti-ES-Tcra na sensibilização da fase sólida foram testadas as seguintes concentrações: 3,4; 0,85; 0,56; 0,34; 0,23 e 0,17 µg/mL, com título dos conjugados AcMo anti-ES-Tcra biotinilado e avidina-peroxidase fixos, respectivamente, em 1:2.000 e 1:12.000. Foram realizados diferentes controles do ensaio para o estudo das possíveis reatividades entre seus componentes. Dessa forma foram avaliadas as possíveis interações entre: AcMo anti-ES-Tcra, substrato cromogênico e AcMo anti-ES-Tcra na placa; avidina-peroxidase, substrato cromogênico e AcMo anti-ES-Tcra na placa; AcMo anti-ES-Tcra biotinilado, avidina-peroxidase, substrato cromogênico e AcMo anti-Es-Tcra na placa (branco da

reação); avidina-peroxidase, substrato cromogênico e fase sólida; AcMo anti-ES-Tcra biotinilado e fase sólida.

Após análise dos resultados obtidos foram realizados ensaios utilizando-se amostras controle positivo (C+) e negativo (C-) para visualização da diluição ideal de AcMo anti-ES-Tcra fixo na placa que melhor permitisse a diferenciação entre as amostras controle, diluídas a 1:20, 1:100, 1:200 e 1:400. Foi utilizada curva padrão com o Ag LV-Tcra em concentrações que variaram de 1.000 ng a 7,81 ng com fator de diluição 2. As concentrações testadas de AcMo anti-ES-Tcra foram 0,85; 0,34; 0,23 e 0,17 $\mu\text{g/mL}$. Os conjugados AcMo anti-ES-Tcra biotinilado e avidina-peroxidase permaneceram, respectivamente, nas diluições de 1:2.000 e 1:12.000.

A concentração de AcMo anti-ES-Tcra estabelecida para sensibilização da placa foi de 0,34 $\mu\text{g/mL}$. Foi realizada, então, titulação em bloco dos conjugados AcMo anti-ES-Tcra biotinilado (diluído a 1:500, 1:1.000, 1:2.000 e 1:2.500) e a avidina-peroxidase (diluída a 1:5.000, 1:10.000 e 1:12.000). A partir dos resultados obtidos, as diluições de escolha foram 1:2.500 e 1:10.000, respectivamente, para o AcMo anti-ES-Tcra biotinilado e a avidina-peroxidase.

Devido a possível formação de imunocomplexos circulantes dois tratamentos prévios ao ensaio de quatro amostras controle positivo e controle negativo foram testados. O primeiro foi realizado segundo Dorny et al. (2000) utilizando ácido tricloroacético (TCA) e o segundo, por aquecimento a 100°C (VAN KERCKHOVEN et al., 1998). No primeiro tratamento, as amostras de soro foram diluídas a 1:2 em TCA 5% e incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Após, seguiu-se centrifugação a 10.000 g, o sobrenadante gerado foi neutralizado com igual volume de

tampão carbonato/bicarbonato de sódio a 0,6 M com pH 10. O segundo tratamento se baseava no aquecimento das amostras a 100°C por 15 minutos previamente a sua utilização no ensaio.

Para avaliação da correlação entre os ensaios utilizamos curvas com o Ag LV-Tcra em diluições sucessivas partindo de 1 µg a 7,81ng, com fator de diluição 2. A curva foi realizada em todas as reações, sendo a correlação entre os ensaios analisada pelo coeficiente de determinação (r^2) da curva.

Após o estabelecimento de todas as condições analisadas, as placas de microtitulação de 96 cavidades em fundo plano Costar® (High Binding, Corning Incorporated, EUA) foram sensibilizadas com AcMo anti-ES-Tcra, obtido por Espíndola et al. (2002) a 0,34 µg/mL em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,02 M. Seguidas de incubação a 37°C por 2 horas e a 4°C durante 15 a 18 horas em câmara úmida. Solução de albumina bovina 3% (BSA, Sigma Chem. Co., EUA) em tampão PBS Tween 0,05%, pré-oxidada com meta-periodato de sódio a 10 mM durante 6 horas a temperatura ambiente e dialisada em PBS (GLASS et al., 1981) foi utilizada para bloqueio. Como solução diluente das amostras e conjugados foi utilizada solução pré-oxidada de BSA 1% em PBS Tween 0,05%. Todas lavagens foram realizadas com solução de NaCl 0,15 M contendo 0,05% de Tween 20 e os conjugados incubados a 37°C por 1 hora. Após lavagem, amostras de soro diluídas a 1:100 foram adicionadas e incubadas por 1 h a 37°C e por 15 a 18h a 4°C. Posteriormente a lavagem foi adicionado o conjugado AcMo anti-ES-Tcra biotinilado (BAYER et al., 1976, GUESDON et al., 1979; BAYER; WILCHECK, 1980) diluído a 1:2.500. Após incubação e lavagem, foi adicionado o segundo conjugado avidina-peroxidase (Sigma Chem. Co., EUA)

diluído a 1:10.000. A solução substrato-cromogênica utilizada foi ortofenilenodiamina (OPD, Sigma Chem. Co EUA) e H_2O_2 a 30% (Merck, Alemanha). A reação enzimática foi bloqueada após 15 minutos com ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração quantificada em leitor de placas em comprimento de onda 492 nm. O branco da reação consistiu em todas as etapas descritas acima com exceção da amostra, em seu lugar foi adicionada solução diluente da amostra. Os resultados foram expressos em índice de reatividade (IR) obtidos pela razão entre as absorbâncias das amostras e a absorbância do branco da reação. A Figura 2 representa esquematicamente a reação.

A correlação dos ensaios realizados foi avaliada pelo coeficiente de determinação (r^2) obtido utilizando curva padrão com o Ag LV-Tcra, partindo de 1 µg a 7,81 ng.

Figura 2. Representação esquemática do ELISA Sanduíche para pesquisa de antígenos circulantes de cisticerco de *T. solium*. Para sensibilização da placa foi utilizado AcMo anti-ES-Tcra (0,34 µg/mL), seguido de incubação da amostra. Após ligação do antígeno de interesse com o AcMo anti-ES-Tcra seguiram-se os conjugados. Para amplificação do sinal foi utilizado o sistema avidina-biotina, com biotina conjugada ao AcMo anti-ES-Tcra (1:2.500) e a avidina-peroxidase (1:10.000).

3.5.2. ELISA Direto

Em todos ensaios foram realizados controle da reatividade do conjugado e do branco da reação. Para análise de reatividade inespecífica do conjugado todas as etapas do ensaio foram realizadas, com exceção da adição do AcMo anti-ES-Tcra. Enquanto que para o branco da reação, a placa de ELISA foi sensibilizada com solução diluente das amostras ao invés da utilização das mesmas.

Inicialmente foi ensaiado o AcMo anti-ES-Tcra nas concentrações de 3,4; 1,7 e 0,85 $\mu\text{g/mL}$. Para a realização do ensaio utilizamos soro controle positivo e negativo, além da curva com antígeno de LV-Tcra variando de 1.000 a 7,81 ng. A diluição do conjugado anti-IgG-peroxidase utilizada foi a recomendada pelo fabricante (1:2.000). A concentração de escolha de AcMo anti-ES-Tcra foi 1,7 $\mu\text{g/mL}$.

Foi realizada titulação do conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase (Sigma Chem. Co., EUA) a 1:1.000, 1:1.500, 1:2.000 e 1:3.000. Sendo a diluição de escolha 1:1.500.

Para avaliação da correlação entre os ensaios foram utilizadas curvas com o Ag LV-Tcra; para tanto, foram realizadas diluições sucessivas partindo de 1.000 a 7,81ng, com fator de diluição 2. A curva fez parte de todos os ensaios, sendo a correlação analisada pelo coeficiente de determinação (r^2) da curva.

Após determinação das condições ideais de AcMo anti-ES-Tcra e anti-IgG de camundongo-peroxidase, placas de microtitulação de 96 cavidades em fundo plano Costar® (High Binding, Corning Incorporated, EUA) foram sensibilizadas com as amostras diluídas a 1:40 em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas a 4°C

durante 15 a 18 horas em câmara úmida. Todas incubações foram realizadas a 37°C e as placas foram lavadas com 0,15 M NaCl contendo 0,05% de Tween 20.

Como solução de bloqueio foi utilizada albumina bovina 3% (BSA, Sigma Chem. Co., EUA) em tampão PBS Tween 0,05%, pré-oxidada com metaperiodato de sódio a 10 mM durante 6 horas a temperatura ambiente e dialisada em PBS (GLASS et al., 1981) e como solução diluente das amostras e conjugados, solução de BSA 1% em PBS Tween 0,05% pré-oxidada com metaperiodato de sódio conforme o descrito. Após lavagem, foi adicionado AcMo anti-ES-Tcra a 1,7 µg/mL. O conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase (Sigma Chem. Co., EUA) foi diluído a 1:1.500. Após incubação e lavagens, foi utilizada a solução substrato-cromogênica ortofenilenodiamina (OPD, Sigma Chem. Co. EUA) e H₂O₂ 30% (Merck, Alemanha). A reação enzimática foi bloqueada após 15 minutos com ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas em comprimento de onda 492 nm. A Figura 3 representa esquematicamente o ELISA Direto.

Figura 3. Representação esquemática do ELISA Direto para pesquisa de antígenos circulantes de cisticerco de *T. solium*. A placa foi sensibilizada com o soro dos suínos (diluídos a 1:40) em estudo. O AcMo anti-ES-Tcra (1,7 µg/mL) foi adicionado, se ligando ao antígeno de interesse presente na amostra. O conjugado utilizado foi anti-IgG de camundongo-peroxidase (diluído a 1:1.500).

3.6. DETECÇÃO DE ANTICORPOS da classe IgG anti- cisticercos de *T. solium*

3.6.1. Padronização de ELISA Indireto

Visando a padronização do ELISA Indireto para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium* foi realizada titulação em bloco com o Ag LV-Tcra e conjugado anti-IgG de suíno-peroxidase. Foram testadas as concentração de 0,05 e 0,1 µg de Ag LV-Tcra e as diluições 1:500, 1:2.000, 1:4.000 e 1:6.000 do conjugado anti-IgG de suíno - peroxidase (Sigma, Alemanha). Para tanto, foram utilizadas duas amostras controle positivo e uma controle negativo nas diluições 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. Foram escolhidas as condições que permitiram melhor diferenciação entre as amostras controle positivo e o controle negativo.

Após estabelecimento das condições do ELISA Indireto, placas de microtitulação

de 96 cavidades com fundo plano Costar® (High Binding, Corning Incorporated, EUA) foram sensibilizadas com 0,05 µg do Ag LV-Tcra em tampão carbonato/bicarbonato 0,5M pH 9,6 e incubadas a 4°C durante 15 a 18 horas em câmara úmida. As placas foram bloqueadas com solução bloqueadora (leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20. Como diluente das amostras e conjugado foi utilizada solução de leite desnatado 1% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20.

Amostras de soro (diluídas a 1:50), conjugado [imunoglobulina de camundongo anti-IgG de suíno-peroxidase (Sigma, Alemanha) diluída a 1:6.000] e solução substrato-cromogênica ortofenilenodiamina (OPD, Sigma Chem. Co EUA)/ H₂O₂ 30% (Merck, Alemanha) foram utilizadas.

As incubações foram realizadas a 37°C por 1 h em todas as etapas, com exceção da incubação com o substrato cromogênico (15 minutos). A reação enzimática foi bloqueada com adição de ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas (SLT-Spectra) em comprimento de onda 492 nm. Foram realizadas lavagens das placas entre as etapas de bloqueio, incubação de amostra e incubação do conjugado com solução salina contendo 0,05% de Tween 20 (Merck, Schuchardt, Munchen, Alemanha).

Em cada teste foi realizado controle-branco que se constituiu do teste sem amostra para se verificar a reatividade de fundo (*background*) da reação. Também foi realizado controle que se constituiu do teste sem antígeno e sem amostra para a verificação da reatividade do conjugado com a placa.

3.6.2. IMUNOBLLOT

3.6.2.a. Imunoblot com Antígeno 18/14-Tcra (IB18/14)

O antígeno 18/14-Tcra foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (USB Corporation Cleveland, EUA) sob condições redutoras, em sistema descontínuo (LAEMMLI, 1970).

Foi utilizado gel de separação 15% e gel de empilhamento 5% em sistema descontínuo. O Ag 18/14-Tcra foi aplicado na concentração de 1 µg/mm e 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, EUA) segundo a metodologia descrita por Towbin et al. (1979). A transferência foi realizada em sistema úmido utilizando cuba eletroforética (TE 42 Transphor Unit, Amersham Pharmacia Biotech, New Jersey, EUA) 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), descorada com água destilada para a retirada do excesso de corante e armazenada entre papéis de filtro a 4°C.

Após a transferência do Ag 18/14-Tcra separado por SDS-PAGE, as membranas

de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3mm, lavadas em água destilada e em solução de lavagem e bloqueados os sítios reativos remanescentes durante 2 horas em tampão de bloqueio (solução de leite desnatado 5% em PBS pH 7,2 com 0,3% de Tween 20), sob agitação constante e a temperatura ambiente. Como diluente de amostra foi utilizada solução de leite desnatado 1% em PBS pH 7,2 com 0,3% de Tween 20. Para pesquisa de anticorpos IgG, os soros foram diluídos a 1:50 em solução diluente e incubados durante 18 horas a 4°C, sob constante e leve agitação. Após a incubação das amostras, seguiram-se lavagens com PBS pH 7,2 contendo 0,3% de Tween pré-aquecido a 50°C sob agitação a temperatura ambiente. Como conjugado utilizou-se anti-IgG de suíno-peroxidase (CDC – GAPrG (h&l) POD-D, EUA) diluído a 1:8.000 em solução PBS pH 7,2 com 0,3% de Tween 20, com incubação de 1 hora. A reação foi revelada com solução cromogênica 4-cloro- α - naftol (Sigma Chemical Company, EUA) ou diaminobenzidina/H₂O₂ (Sigma Chemical Company, EUA) sob agitação constante até o aparecimento das bandas reativas e, então, bloqueada com água destilada.

O IB 18/14 foi considerado reagente quando apresentou reatividade com pelo menos um dos peptídeos de 14 e/ou 18 KDa.

3.6.2.b. Imunoblot com antígeno de *T. solium* purificado por cromatografia de afinidade utilizando coluna de lentil-lectina (IB LLGP)

Foram utilizadas membranas contendo o Ag de *T. solium* purificado por cromatografia de afinidade utilizando coluna de lentil-lectina (TSANG et al., 1989)

provenientes do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, EUA, cedidas pelo Profº Dr. Victor C.W. Tsang.

Segundo Tsang et al. (1989) os cisticercos de *T. solium* após homogeneização, centrifugações sucessivas e sonicação, originaram sobrenadante que foi purificado em coluna de sefarose G25 (Pharmacia, EUA) e concentrado por ultrafiltração a 250.000 g em membrana YM-20 (Amicon, Danvers, Mass, EUA).

O imunoblot foi processado de acordo com Tsang et al. (1989). O procedimento é semelhante ao descrito no item 3.6.b1 com as seguintes modificações: o diluente de amostra foi composto por solução de leite desnatado 5% em PBS pH 7,2 com 0,3% de Tween 20; a solução cromogênica utilizada foi de 3,3' – diaminobenzidina/H₂O₂ (Sigma Chemical Company, EUA).

O IB LLGP foi considerado reagente quando apresentou reatividade com pelo menos um dos peptídeos de 50-, 39-42-, 24-, 21-, 18-, 14- e 13 kDa.

3.7. DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE REATIVIDADE DOS TESTES UTILIZANDO-SE A CURVA ROC

Os diferentes pontos (*cut-off*) nos quais se discriminam o grupo portador da doença em estudo do grupo sadio resultarão 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 a de falsos positivos (Tabela 1). 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.

Tabela 1. Correlação entre os valores de área sob a curva obtidos pela aplicação da Curva ROC e sua interpretação em relação ao desempenho do teste em análise.

Área sob a curva	Interpretação
> 0,9	Desempenho excelente
0,8-0,9	Desempenho bom
0,7-0,8	Desempenho razoável
< 0,7	Desempenho ruim

O cálculo da área sob a curva ROC é feito através do método trapezoidal ou a estatística U de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas de duas amostras do teste Wilcoxon. Sobre todos os pontos ao longo da curva ROC, o ângulo da curva é a taxa de verdadeiros positivos e falsos positivos, também conhecidos como razão de

probabilidades (KOLLEF; SHUSTER, 1994; RUTTIMANN, 1994).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o “software” Sigma Stat (Jandel Scientific). Para todos os testes foi aceito um erro do tipo I de 5% (probabilidade $< 0,05$ foi considerada como estatisticamente significativa).

Todos os dados nas diferentes análises realizadas foram submetidos ao teste de normalidade e de homogeneidade de variâncias. Testes paramétricos foram empregados quando a distribuição dos dados foi normal e as variâncias homogêneas. Na impossibilidade de normalização dos dados, foram empregados testes não paramétricos

Na análise de resultados de amostras independentes empregou-se o teste ANOVA (paramétrico) e Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

A verificação das diferenças nos valores das medianas entre os grupos de amostras controle positivo e controle negativo foi realizada utilizando-se o Método de Dunn.

Para a comparação da concordância entre as seguintes metodologias: ELISA Sanduíche, ELISA Direto, ELISA Indireto e IB 18/14 foi utilizado o Índice Kappa (κ). As diretrizes relatadas por Dawson et al. (2001) foram seguidas para a interpretação de κ (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação entre os possíveis valores de Índice Kappa obtidos e sua interpretação em relação à concordância entre testes.

Índice Kappa	Concordância
0,93-1,0	Excelente
0,81-0,92	Muito boa
0,61-0,80	Boa
0,41-0,60	Regular
0,21-0,40	Discreta
0,01-0,20	Ausente

É válido ressaltar que a concordância entre dois testes não indica que ambos possuam a mesma sensibilidade e especificidade, nem serve como medida das mesmas.

4. RESULTADOS

4.1. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Ao término do experimento (t140) os animais foram sacrificados e a musculatura, cérebro e órgãos viscerais foram seccionados em pedaços de aproximadamente 0,5 cm para a procura de cistos. O número total de cisticercos encontrados variou muito de um suíno para outro (1 a 85 com média de 33,7 e desvio padrão de 31,3). Os dados obtidos foram demonstrados detalhadamente no Anexo II, que trata da distribuição dos cisticercos por órgãos e regiões nos suínos experimentalmente infectados. Todos os cisticercos encontrados foram considerados viáveis, uma vez que se apresentavam translúcidos e com escólex visível através da membrana, indicando ausência de processo de degeneração ou de calcificação. Os cisticercos mediam aproximadamente 0,1cm a 0,3 cm de diâmetro. A eficiência da infecção experimental obtida foi baixa, apresentando média de 0,17‰ (0,01‰ a 0,42‰).

4.2. PADRONIZAÇÃO

4.2.1. ELISA Sanduíche para a Pesquisa de Antígenos

4.2.1.a. Estabelecimento da Quantidade Ideal de AcMo anti-ES-Tcra para Sensibilização da Placa utilizando Ag LV-Tcra

Os resultados da padronização do ELISA Sanduíche utilizando Ag LV-Tcra nas concentrações de 1.000 ng, 200 ng e 50 ng (respectivamente F, G e H) e o estudo das possíveis interações: do substrato cromogênico e AcMo anti-ES-Tcra na placa (A); da

avidina-peroxidase (1:12.000), substrato cromogênico e AcMo anti-ES-Tcra na placa (B); do AcMo anti-ES-Tcra biotinilado (1:2.500), avidina-peroxidase, substrato cromogênico e AcMo anti-ES-Tcra na placa (C); da avidina-peroxidase, substrato cromogênico e fase sólida (D); do AcMo anti-ES-Tcra biotinilado, substrato cromogênico e fase sólida (E) estão apresentados na Figura 4. O AcMo anti-ES-Tcra foi utilizado nas concentrações de 3,4; 0,85; 0,56; 0,34; 0,23 e 0,17 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 4. Avaliação da quantidade de AcMo anti-ES-Tcra ideal para sensibilização das placas e análise da possível interação dos componentes do ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígeno. Foram avaliadas as interações: (A) do substrato cromogênico com AcMo anti-ES-Tcra na placa ; (B) da avidina-peroxidase (1:12.000) e substrato cromogênico com AcMo anti-ES-Tcra na placa; (C) do AcMo biotinilado (1:2.500), avidina-peroxidase e substrato cromogênico com AcMo anti-Es-Tcra na placa (branco); (D) da avidina-peroxidase com substrato cromogênico e fase sólida; (E) do AcMo anti-ES-Tcra biotinilado com substrato cromogênico e fase sólida; (F,G e H) da reação para detecção de diferentes concentrações do antígeno LV-Tcra, sendo estas, respectivamente, 1.000, 200 e 50 ng. O AcMo anti-ES-Tcra foi utilizado nas concentrações de 3,4; 0,85; 0,56; 0,34; 0,23 e 0,17 $\mu\text{g/mL}$.

Alta reatividade de fundo foi observada utilizando o AcMo anti-ES-Tcra a 3,4 $\mu\text{g/mL}$, não permitindo a diferenciação das concentrações do antígeno LV-Tcra utilizadas. Dessa forma, o uso dessa concentração foi descartado.

4.2.1.b. Verificação da Concentração Ideal de AcMo anti-ES-Tcra para Sensibilização da Placa utilizando amostras Controle Positivo (C+) e Negativo (C-)

A Figura 5 demonstra as absorbâncias obtidas em ELISA Sanduíche utilizando amostras C+ e C- em diferentes diluições (1:20, 1:100, 1:200 e 1:400), AcMo anti-ES-Tcra para a sensibilização da placa a 0,85; 0,34; 0,23 e 0,17 $\mu\text{g/mL}$, AcMo anti-Es-Tcra biotinilado diluído a 1:2.500 e avidina-peroxidase a 1:12.000.

Figura 5. Absorbâncias obtidas com diferentes concentrações de AcMo anti-ES-Tcra para sensibilização da placa no ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígeno fixando as concentrações o AcMo anti-ES-Tcra biotinilado (1:2.500) e da avidina-peroxidase (1: 12.000), e utilizando soros de suínos controle positivo (C+) e controle negativo (C-) nas diluições 1:20 a 1:400.

A concentração de AcMo anti-ES-Tcra estabelecida para sensibilização das placas foi 0,34 $\mu\text{g/mL}$, pois houve melhor diferenciação entre as amostras controle positivo e negativo (Figura 5). Adicionalmente, a curva de Ag LV-Tcra apresentou melhor coeficiente de determinação (r^2) também com essa concentração (Figura 6).

Figura 6. Representação linear das absorbâncias obtidas para diferentes concentrações de Ag LV-Tcra (curva partindo de 1.000 até 7,81) no ELISA Sanduíche para pesquisa de antígeno, fixando-se as concentrações de AcMo anti-ES-Tcra biotinilado (1:2.500) e da avidina-peroxidase (1:12.000), utilizando diferentes concentrações de AcMo anti-ES-Tcra para sensibilização da placa (0,34; 0,23 e 0,17 $\mu\text{g/mL}$).

A titulação dos conjugados AcMo anti-ES-Tcra biotinilado e avidina-peroxidase não apresentou diferença significativa na diferenciação das amostras C+ e C- para as diluições de 1:2.000 e 1:2.500 do AcMo anti-ES-Tcra marcado com biotina e de 1:10.000 e 1:12.000 da a avidina-peroxidase, porém o branco da reação obtido foi mais baixo ao se utilizar o AcMo anti-ES-Tcra biotinilado a 1:2.500 e a avidina-peroxidase a 1:10.000, sendo estas as diluições de escolha.

4.2.1.c. Análise do Tratamento Prévio das Amostras por TCA e Aquecimento

Os resultados em índice de reatividade (IR) obtidos para quatro amostras C+ e quatro amostras C- sem tratamento prévio e após tratamento com TCA ou aquecimento antecedendo a realização do ensaio, nas condições estabelecidas anteriormente estão apresentados na Figura 7.

Figura 7. Resultados em Índice de Reatividade (IR) obtidos para quatro amostras controle positivo e quatro controle negativo sem tratamento ou com tratamento prévio por aquecimento a 100°C por 15 minutos ou por uso de TCA no ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígeno. As médias obtidas nas amostras controle nas diferentes situações estão representadas por (-).

Foi observado aumento da inespecificidade da reação ao se utilizar TCA ou aquecimento prévio, havendo aumento nos índices de reatividade dos controles negativos. Dessa forma os tratamentos foram abolidos dos experimentos subsequentes.

4.2.1.d. Curva Média com o Ag LV-Tcra

Os resultados do ELISA Sanduíche para as quatro primeiras concentrações do Ag LV-Tcra (1.000, 500, 250 e 125 ng) da curva média de nove ensaios está representada na Figura 8 A, enquanto que a curva média para as demais concentrações, incluindo a de 125 ng (125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 ng) está representada na Figura 8 B.

Figura 8. Curva média de nove ensaios do ELISA Sanduíche representando a correlação linear dos Índices de Reatividade (IR) obtidos. Sendo que **A** abrange as concentrações de 1.000, 500, 250 e 125 ng do antígeno de LV-Tcra e **B** as concentrações de 125, 62,5, 31,25, 15,62 e 7,81 ng.

4.2.1.e. ELISA Sanduíche em Amostras Controle Positivo e Negativo

Para definição mais precisa do *cut off* foram construídas curvas ROC com os resultados obtidos nas diferentes diluições das amostras controle positivo e negativo,

considerando os pontos de corte estabelecidos com um e dois desvios padrões e o intervalo entre eles (cálculo realizado automaticamente pelo programa) procurando um valor que possibilitasse parâmetros de sensibilidade e especificidade mais próximos possíveis dos ideais. A diluição de escolha para as amostras foi 1:100 e o *cut off* correspondente foi de 2,19. Os resultados obtidos expressos em índice de reatividade estão representados na Figura 9 e nos Anexos III e IV respectivamente, para as amostras controle positivo e controle negativo.

Figura 9. Resultados em índice de reatividade (IR) para a pesquisa de antígeno circulante por ELISA Sanduíche em 14 amostras controle positivo e 15 amostras controle negativo. Houve diferença estatística significativa entre as amostras controle positivo e negativo, $p = 8,11 \times 10^{-10}$ (Dunn e Kruskal-Wallis).

De acordo com o apresentado na Figura 9, 14% (2 soros) das amostras controle positivo e 100% (15 soros) das amostras controle negativo encontraram-se abaixo do *cut off*.

Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia (intervalo de confiança de 95%) foram, respectivamente, 86%, 100% e 98%.

4.2.2. ELISA Direto para a pesquisa de Antígeno

4.2.2.a. Verificação da Diluição Ideal de AcMo anti-ES-Tcra

Os resultados obtidos no teste ELISA Direto utilizando as concentrações do AcMo anti-ES-Tcra a 3,4; 1,7 e 0,85 $\mu\text{g/mL}$ para a detecção de antígeno em amostras de soro de suínos controle positivo e negativo, fixando o conjugado anti-IgG de camundongo (1:2.000) estão apresentados na Figura 10.

Figura 10. Absorbâncias obtidas para diferentes concentrações de AcMo anti-ES-Tcra no ELISA Direto para pesquisa de antígeno, fixando a concentração do anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase (1:2.000) e utilizando soros de suíno controle positivo (C+) e negativo (C-) nas diluições 1:10 a 1:640.

Foi observada melhor diferenciação entre os as amostras controle positivo e negativo utilizando AcMo anti-ES-Tcra a 1,7 µg/mL.

4.2.2.b. Titulação do conjugado anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase

Fixando-se a concentração do AcMo anti-ES-Tcra a 1,7 µg/mL e utilizando-se diferentes diluições do conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase a 1:1.000, 1:1.500, 1:2.000 e 1:3.000 foi obtido o título ideal de 1:1.500 (Figura 11).

Figura 11. Absorbâncias obtidas para diferentes concentrações do conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase no ELISA Direto para a pesquisa de antígeno circulante, fixando a concentração de AcMo anti-ES-Tcra (1,7 $\mu\text{g/mL}$) e utilizando soros de suíno controle positivo (C+) e negativo (C-) nas diluições 1:40 a 1:640.

4.2.2.c. Curva Média com o Ag LV-Tcra

A Figura 12 A representa os resultados do teste ELISA Direto com as quatro primeiras concentrações (1.000, 500, 250 e 125 ng) da curva média de dez ensaios enquanto que a Figura 12 B demonstra os resultados das demais concentrações, incluindo a de 125 ng (125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 ng de Ag LV-Tcra).

Figura 12. Curva média de dez ensaios do ELISA Direto representando a correlação linear das absorbâncias obtidas. Sendo que **A** abrange as concentrações de 1.000, 500, 250 e 125 ng do antígeno de LV-Tcra e **B** as concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 ng.

4.2.2.d. ELISA Direto em Amostras Controle Positivo e Controle Negativo

O estabelecimento da melhor diluição das amostras e dos parâmetros de sensibilidade e especificidade, bem como do *cut off* para o ELISA Direto se deu pela

análise das Curvas ROC nas diferentes diluições das amostras ensaiadas. Para tanto, foram considerados os pontos de corte estabelecidos com um e dois desvios padrões e o intervalo entre eles (cálculo realizado automaticamente pelo programa) procurando um valor que possibilitasse parâmetros mais próximos possíveis dos ideais. A diluição de escolha para as amostras foi 1:40 e o respectivo *cut off* foi de 0,39. Os resultados obtidos correspondentes a essas condições estão apresentados na Figura 13 e nos Anexos III e IV respectivamente, para as amostras controle positivo e controle negativo.

Figura 13. Resultados em absorbância para a pesquisa de antígeno circulante por ELISA Direto em 14 amostras controle positivo e 15 amostras controle negativo. Houve diferença estatística significativa entre as amostras controle positivo e negativo, $p = 2,87 \times 10^{-6}$ (Dunn e Kruskal-Wallis).

De acordo com o representado na Figura 13, todas (100%) amostras controle positivo e quatro (27%) amostras controle negativo encontraram-se acima do *cut off*.

Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia foram respectivamente, de 100%, 73% e 96%.

4.2.3. ELISA Indireto para a Pesquisa de Anticorpos

4.2.3.a. Titulação em bloco do antígeno LV-Tcra e conjugado anti-IgG suína marcada com peroxidase

Os melhores resultados da titulação em bloco foram Ag LV-Tcra a 0,05 µg/poço para sensibilização da placa e conjugado anti-IgG de suíno-peroxidase a 1:6.000, já que permitiram melhor diferenciação entre as amostras controle positivo e controle negativo. Os resultados da titulação de duas amostras de soro de suínos controle positivo, e uma controle negativo nas condições estabelecidas para pesquisa de anticorpos em soro de suínos estão apresentados na Figura 14.

Figura 14. Absorbâncias obtidas no teste ELISA Indireto para pesquisa de Ac utilizando-se duas amostras de soro controle positivo (C+) e uma amostra de soro controle negativo (C-) nas diluições de 1:50 a 1:800, com Ag LV-Tcra (0,05 µg/poço) para sensibilização da placa e conjugado anti-IgG de suíno-peroxidase a 1: 6.000.

4.2.3.b. ELISA Indireto nas Amostras Controle Positivo e Controle Negativo

A determinação do *cut off* e a melhor diluição das amostras se deram através da análise das Curvas ROC e dos parâmetros de sensibilidade e especificidade obtidos nas diferentes diluições das amostras ensaiadas, considerando os pontos de corte estabelecidos com um e dois desvios padrões e o intervalo entre eles (cálculo realizado automaticamente pelo programa) procurando um valor que possibilitasse parâmetros mais próximos possíveis dos ideais. A melhor diluição das amostras foi 1:50 e o *cut off* correspondente 0,55. Os resultados obtidos nestas condições estão apresentados na Figura 15 e nos Anexos III e IV respectivamente, para as amostras controle positivo e controle negativo.

Figura 15. Resultados em absorbância do ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos anti-cisticercose de *T. solium* da classe IgG utilizando Ag LV-Tcra (0,5 µg/well) em 14 amostras de soro controle positivo e 15 amostras de soro controle negativo. Diferença significativa entre as amostras controle positivo e negativo, $p = 3,53 \times 10^{-6}$, (Dunn e Kruskal-Wallis).

O ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos da classe IgG apresentou 13 (93%) amostras de soro controle positivo acima do *cut off* e 15 (100%) amostras de soro controle negativo abaixo do *cut off*.

A sensibilidade foi de 93%, enquanto que tanto a especificidade quanto a acurácia obtidas foram de 100%.

4.2.4. Imunoblot para Pesquisa de Ac utilizando IB 18/14

O IB 18/14 foi realizado em 14 amostras controle positivo e 15 amostras controle negativo.

Todas as amostras controle positivo apresentaram reatividade com pelo menos uma das frações de 18- e/ou 14 kDa. As amostras de soro de 10 animais (71%) apresentaram reatividade com ambas as frações, enquanto que as amostras de soro de 3 animais (21%) apresentaram reatividade somente com a fração de 14 kDa e uma amostra (7%) somente com a fração de 18 KDa. Sendo assim, 13 (93%) amostras de soro reconheceram a fração de 14 kDa, enquanto que 11 (78%) reconheceram a de 18 kDa.

Todas as amostras controle negativo apresentaram IB não reagente, ou seja, não houve formação de bandas correspondentes à região de 18- e/ou 14 kDa.

4.3. PESQUISA DE ANTÍGENO E ANTICORPOS NO GRUPO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE

4.3.1. Pesquisa de Antígeno

4.3.1.a. ELISA Sanduíche

A diluição das amostras de soro a 1:100 e o *cut off* 2,19, determinados conforme descrito (item 4.2.1.e - ELISA Sanduíche) foram aplicados às diferentes amostras dos

animais experimentalmente infectados. Os índices de reatividade obtidos estão apresentados na Figura 16 e no Anexo V.

Figura 16. Resultados em Índice de Reatividade (IR) obtidos no ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígeno circulante em amostras de soro referentes aos diferentes tempos de coleta após a infecção experimental dos sete animais do grupo cinética. Os animais estão representados conforme o número de cisticercos encontrados no exame *post-mortem*.

Para a pesquisa de antígeno por ELISA Sanduíche nas amostras de soro dos animais infectados experimentalmente foi observada positividade em 4 animais, correspondendo a 57 % do total de animais (7) no momento do abate (t140).

4.3.1.b. ELISA Direto

A diluição de 1:40 e o *cut off* 0,39, determinados conforme descrito (item 4.2 b - ELISA Direto) foram aplicados às diferentes amostras de soro dos animais experimentalmente infectados. Os resultados obtidos estão representados na Figura 17 e no Anexo VI.

Figura 17. Resultados em absorbância obtidos no ELISA Direto para a pesquisa de antígeno circulante nas amostras de soro referentes aos diferentes tempos de coleta após a infecção experimental dos sete animais do grupo cinética. Os animais estão representados conforme o número de cistos encontrados no exame *post-mortem*.

A pesquisa de antígeno por ELISA Direto para animais com baixa carga parasitária não se apresentou satisfatória, já que no momento do abate (t140) nenhum animal infectado experimentalmente foi detectado (Figura 17).

4.3.2. Pesquisa de Anticorpos

4.3.2.a. ELISA Indireto

Os resultados do grupo infectado experimentalmente foram avaliados de acordo com os parâmetros estabelecidos (item 4.2.3.b – ELISA Indireto). Os valores de absorbância obtidos estão apresentados na Figura 18 e no Anexo VII.

Figura 18. Resultados em absorbância para pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium* da classe por ELISA Indireto utilizando Ag LV-Tcra (0,5 µg) em amostras de soro referentes aos diferentes tempos de coleta após a infecção experimental dos sete animais do grupo cinética. Os animais estão representados conforme o número de cistos encontrados no exame *post-mortem*.

A pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-cisticerco de *T. solium* apresentou positividade para 5 animais (71%) do grupo infectado experimentalmente no momento do abate (t140). Os animais portadores de 60 e 11 cistos não foram detectados neste momento.

4.3.2.b. Imunoblot

Todas as amostras de soro dos animais infectados experimentalmente foram submetidas ao IB 18/14. Devido ao número limitado de tiras disponíveis para o IB LLGP, somente os soros dos suínos com 60 e 85 cisticercos foram ensaiados em todos os tempos, já que se tratava dos animais com maior número de cisticercos encontrados.

Para a utilização do IB LLGP nos outros animais infectados experimentalmente foram ensaiados os soros correspondentes a partir do tempo anterior à primeira reatividade observada no IB 18/14. Caso houvesse reatividade em uma amostra de soro correspondente a um tempo de coleta no IB 18/14, a amostra correspondente ao tempo de coleta anterior, além das amostras subseqüentes, seriam também submetidas ao IB LLGP e assim sucessivamente, possibilitando a análise da reatividade das amostras de soro por IB com os diferentes antígenos.

A Tabela 3 demonstra as primeiras amostras (expressas em tempo de coleta) ensaiadas e as primeiras amostras nas quais foi observada reatividade para os ensaios IB 18/14 e LLGP com soros dos suínos infectados experimentalmente. No Anexo VIII foram apresentados todos os dados dos ensaios realizados.

Tabela 3. Resultados referentes às amostras de soro dos suínos infectados experimentalmente correspondentes ao primeiro tempo ensaiado e a primeira reatividade encontrada para o IB 18/14 e IB LLGP. Cada animal foi representado pelo número de cisticercos encontrados em seu exame *post-mortem*.

Animal (por nº de cistos)	IB 18/14 (kDa)		IB LLGP (kDa)	
	Primeiro tempo ensaiado	Aparecimento de reatividade	Primeiro tempo ensaiado	Aparecimento de reatividade
85	t14	t70	t14	t70
60	t14	t56	t14	t84
47	t14	t56	t42	t112
26	t14	t70	t56	t70
11	t14	t70	t56	t70
6	t14	t56	t42	t56
1	t14	t56	t42	t56

Os resultados obtidos nos IB 18/14 e IB LLGP utilizando as amostras de soro do suíno com 85 cistos referentes aos diferentes tempos de coleta estão expressos, respectivamente, nas Figuras 19 e 20. Foi observada reatividade a partir do t70 até o término do experimento (t140) em ambos IB.

Figura 19. IB 18/14 das amostras de soro do suíno com 85 cisticercos nos diferentes tempos de coleta. Sendo, C+: amostra controle positivo e C-: amostra controle negativo. A esquerda se encontra o padrão de peso molecular (kDa)

Figura 20. IB LLGP das amostras de soro do suíno com 85 cisticercos nos diferentes tempos de coleta. Sendo, C+: amostra controle positivo e C-: amostra controle negativo. A esquerda se encontra o padrão de peso molecular (kDa)

O IB 18/14 foi reagente para 3 animais (43%) com 1, 47 e 60 cisticercos a partir do t 56, e para mais 2 animais (71%, correspondendo a estes cinco animais) com 26 e 85 cisticercos a partir do t70. Além disso, o animal com 6 cisticercos foi positivo somente no t56 (enquanto que pelo IB LLGP a positividade se manteve até o término do experimento). O suíno com 11 cistos demonstrou reatividade em ambos os testes somente no t70 (sendo positivo somente no t28 por ELISA Indireto para a pesquisa de anticorpos – Figura 18).

A reatividade para o IB LLGP iniciou-se no t56 para 2 animais (29%), com 1 e 6 cisticercos; enquanto que a positividade começou a partir do t70 para outros 2 animais, com 26 e 85 cisticercos (57% correspondendo aos quatro animais). O IB LLGP tornou-se reagente a partir do t84 e t112 para outros 2 animais (totalizando 86%), com respectivamente, 60 e 47 cisticercos. As bandas precocemente reconhecidas foram as de 50- e 24 kDa (29%), embora o padrão de reatividade tenha sido bastante heterogêneo (Tabela 4).

Portanto, a taxa de positividade foi de 71% e de 86% no final do experimento (t140), respectivamente, para o IB 18/14 e IB LLGP.

Tabela 4. Resultados do IB 18/14 e IB LLGP para amostras de soro dos suínos infectados experimentalmente em diferentes tempos de coleta. Cada animal foi representado pelo número de cisticercos encontrados em seu exame *post-mortem* e seus resultados foram expressos em relação ao primeiro tempo (em dias) no qual foi apresentada reatividade. Sendo a reatividade apenas no tempo indicado representada por (*).

Animal Nº de Cistos	IB 18/14		IB LLGP (kDa)						
	18	14	50	39-42	24	21	18	14	13
85	t70	t70	t70	t70	t70	-	t84	-	t84
60	t70	t56	t84	t84	t84	-	-	-	t112
47	t70	t56	t112	-	t140	-	-	t140	t112
26	t84	t70	t70	-	t84	t126	-	t126	t70
11	-	t70*	-	-	-	-	-	t70*	-
6	t56*	t56*	t56	t98	t112	-	-	-	-
1	t56	t56	-	t56	t70	t84	-	t112	-

4.4. PARÂMETROS SOROLÓGICOS DOS TESTES PARA A PESQUISA DE ANTÍGENO E ANTICORPO

Os parâmetros de sensibilidade e especificidade obtidos nas diferentes metodologias aplicadas para pesquisa de Ag e Ac utilizando-se amostras de soro de suínos controle positivo e negativo, bem como a positividade obtida no momento do abate (t140) para os animais infectados experimentalmente estão expressos na Tabela

5.

Tabela 5. Resultados de sensibilidade, especificidade e intervalo de confiança (IC) nas amostras de soro de suínos do grupo controle positivo (C+) e controle negativo (C-), bem como a positividade encontrada no momento do abate (t140) para os soros dos animais infectados experimentalmente nos diferentes métodos: ELISA Sanduíche, ELISA Direto, ELISA Indireto, IB 18/14 e IB LLGP. Os valores de sensibilidade e especificidade para o IB LLGP foram descritos por Tsang et al. (1991).

Método (analito)	C+ (n=14)		C- (n=15)		Grupo Infectado Experimentalmente (n=7)
	Sensibilidade	IC	Especificidade	IC	Positividade (t140)
ELISA Sanduíche (Ag)	86%	(68-100%)	100%	(98-100%)	57%
ELISA Direto (Ag)	100%	(98-100%)	73%	(50-95%)	0%
ELISA Indireto (Ac)	93%	(80-100%)	100%	(98-100%)	71%
B 18/14 (Ac)	100%	(98-100%)-	100%	(98-100%)	71%
B LLGP (Ac)	100% *	-	100% *	-	86%

*: Dados obtidos por Tsang et al. (1991). Este estudo foi realizado com amostras de soro de 137 suínos (n=137), sendo que destes, 45 apresentavam cisticercose confirmada (C+), 45 não possuíam cisticercose (C-) e 47 apresentavam outras parasitoses que não a cisticercose.

4.5. CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES PARA PESQUISA DE ANTÍGENO E ANTICORPO

Os Índices Kappa (κ) obtidos na comparação das diferentes metodologias para pesquisa de antígeno (ELISA Direto e ELISA Sanduíche) e anticorpo (ELISA Indireto e IB 18/14) foram calculados utilizando amostras dos grupos controle positivo e negativo. Dessa forma não foi possível analisar o IB LLGP, já que o mesmo não foi realizado utilizando-se amostras do grupo controle positivo e negativo devido ao número limitado de tiras disponíveis. Foi obtida boa concordância entre as metodologias ELISA Direto e ELISA Sanduíche ($\kappa=0,613$); ELISA Direto e ELISA Indireto ($\kappa=0,665$); ELISA

Sanduiche e ELISA Indireto ($\kappa=0,789$) e IB 18/14 e ELISA Direto ($\kappa=0,726$). A concordância obtida entre o IB 18/14 e o ELISA Sanduíche foi muito boa, com κ de 0,861; enquanto que a concordância entre o IB 18/14 e o ELISA Indireto foi excelente, com κ de 0,930.

4.6. ALGORITMO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE SUÍNA NA TRIAGEM DE ANIMAIS COM INFECÇÃO BRANDA

Foram analisadas diferentes combinações das metodologias estudadas para a pesquisa de Ag e/ou Ac no grupo infectado experimentalmente (infecção branda) utilizando as amostras de soro colhidas nos diferentes tempos após a infecção experimental. Os dados obtidos estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Porcentagem de positividade obtida com os soros dos suínos infectados experimentalmente referentes aos diferentes tempos de coleta, utilizando associação das diferentes metodologias para pesquisa de antígeno circulante [ELISA Sanduíche (ES), ELISA Direto (ED)] e anticorpos da classe IgG anti-cisticerco de *T. solium* [ELISA Indireto (EI), IB 18/14 e IB LLGP]. As amostras de soro estão representadas de acordo com o dia em que foram coletadas após a infecção experimental.

Soros (tempo)	t14	t21	T28	t42	t56	t70	t84	t98	t112	t126	t140
Métodos											
ED (Ag)	0%	0%	0%	29%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
ES (Ag)	43%	43%	43%	29%	29%	43%	43%	43%	57%	57%	57%
EI (Ac)	14%	29%	43%	57%	43%	86%	86%	71%	71%	71%	71%
IB 18/14 (Ac)	0%	0%	0%	0%	57%	86%	71%	71%	71%	71%	71%
IB LLGP (Ac)	0%	0%	0%	0%	29%	71%	71%	71%	86%	86%	86%
ES+ED	43%	43%	43%	43%	29%	43%	43%	43%	57%	57%	57%
ES+EI	57%	57%	57%	71%	71%	100%	100%	86%	100%	86%	86%
EI +ED	43%	29%	43%	71%	43%	86%	86%	71%	71%	71%	71%
IB 18/14+ED	0%	0%	0%	29%	57%	86%	71%	71%	71%	71%	71%
IB LLGP+ED	0%	0%	0%	29%	29%	71%	71%	71%	86%	86%	86%
IB 18/14+ES	43%	43%	43%	29%	71%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
IB LLGP+ES	43%	43%	43%	29%	43%	71%	86%	86%	100%	100%	100%
IB 18/14+EI	14%	29%	43%	57%	86%	100%	86%	86%	86%	86%	86%
IB LLGP+EI	14%	29%	57%	57%	71%	100%	86%	71%	86%	86%	86%

A associação da pesquisa de antígeno por ELISA Sanduíche com um ou outro IB (18/14 ou LLGP) para pesquisa de anticorpos permitiu a detecção de todos os animais no momento do abate (t140). O uso do IB 18/14 associado com a pesquisa de antígeno permitiu a detecção de todos os animais a partir do t70, enquanto que o IB LLGP associado ao mesmo teste para antígeno detectou todos os animais a partir do t112.

De acordo com os resultados, o algoritmo mais adequado para a triagem de suínos com baixa infecção seria a utilização do IB 18/14 ou IB LLGP e a aplicação de ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígenos nas amostras de soro negativas no IB.

5. DISCUSSÃO

Muitos autores concordam que suínos com cisticercose apresentando baixa carga parasitária podem passar despercebidos pelos processos de inspeção dos animais, mantendo, dessa forma, a transmissão do parasita devido à utilização da carne levemente infectada como alimento (NUNES et al., 2000; SCIUTTO et al., 1998).

Em nosso trabalho, nenhum dos animais sacrificados após 140 dias transcorridos da infecção experimental demonstraram aspectos clínicos de cisticercose suína. Eles provavelmente passariam despercebidos pelos exames de inspeção comumente utilizados em matadouros, os quais consistem na inspeção da língua e no exame *post-mortem* (necropsia). Este exame rotineiro consiste na procura de cisticercos em diferentes locais das carcaças, considerados preferenciais para a instalação do parasita, são eles: coração, diafragma, masseters, língua, pescoço, músculos intercostais e abdominais (BOA et al., 2002).

Outros autores concordam que o exame *post-mortem* não é apropriado para a identificação de suínos aparentemente saudáveis, ou seja, com infecção branda, já que os cisticercos poderiam passar despercebidos nestes animais. Isto poderia ocorrer principalmente se os animais fossem provenientes de criação qualificada (GONZALEZ et al., 1990). Além disso, esse exame tem a desvantagem da necessidade de cortes na carne, o que pode ser indesejável devido à perda do valor comercial.

5.1. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

A eficiência da infecção experimental obtida foi baixa, com média de 0,17‰ (variando de 0,01‰ a 0,42‰). Outros autores obtiveram melhores resultados, com eficiência variando de 0,28% a 5% (MOLINARI et al., 1983; PATHAK; GAUR, 1990;

TSANG et al., 1991; NASCIMENTO et al., 1995). De acordo com Nguekam et al. (2003) a ingestão de proglotes inteiras com cerca de 780.000 ovos é a maneira mais eficiente de infecção (aproximadamente 20%). Esta forma de infecção deve predominar quando os suínos são criados livremente em contato com fezes humanas, que contém proglotes grávidas. Em nosso experimento os suínos foram infectados com 200.000 ovos e não com proglotes. Temos que considerar que todos os animais foram expostos a número igual de ovos e possivelmente parte dos parasitas foi eliminada pela resposta imune de alguns animais durante os estágios de desenvolvimento do cisticerco.

Alguns estudos confirmam que a eficiência do estabelecimento da infecção pode diferir entre os animais (ALUJA et al., 1996; LIGHTOWLERS, 1999; SANTAMARIA; PLANCARTE; ALUJA, 2002), e também está ligada à viabilidade dos ovos utilizados para a infecção experimental (SANTAMARIA; PLANCARTE; ALUJA, 2002). Não realizamos estudo de viabilidade embrionária, entretanto, como as proglotes foram armazenadas a 4°C por 28 dias, devemos considerar a possibilidade de que somente poucos ovos estariam viáveis.

O desenvolvimento pleno do parasita desde a fase embrionária até a fase larvária leva cerca de 60 dias após a ingestão dos ovos (REY, 2001). O cisticerco pode permanecer viável (vesicular) na carne dos suínos por vários anos (FREITAS, 1980), ao se iniciar o processo degenerativo o cisticerco passa a ser classificado como caseoso, por seguinte fibrótico e, por fim, calcificado. Gonzalez et al. (1987) relataram a visualização de cisticercos vesiculares em suínos com infecção natural (maciça) através de tomografia computadorizada e exame post-mortem, sendo que nenhuma forma racemosa ou calcificada foi encontrada nos animais em estudo (n=11). Flisser et al. (1988) relataram o encontro de 19 a 88 cisticercos no cérebro de suínos infectados

naturalmente através de tomografia computadorizada, sendo que a resposta imunológica observada frente aos cisticercos foi mínima, já que não foram constatados edema e eventos inflamatórios.

Nossos resultados mostraram somente cistos vesiculares após 140 dias transcorridos da infecção experimental, diferente do encontrado por Santamaría; Plancarte; Aluja (2002) que reportaram a presença de cistos caseosos já a partir de 60 dias após a infecção. Por outro lado, em concordância com nossos resultados, Aluja et al. (1996) encontraram cistos caseosos somente 200 dias após a infecção experimental. Devemos ressaltar que em nosso estudo o *post-mortem* foi cuidadosamente realizado, porém não podemos descartar a possibilidade de parasitas terem passado despercebidos, particularmente se o processo de degeneração dos mesmos já estivesse em andamento.

5.2. PADRONIZAÇÃO DOS IMUNOENSAIOS

Ensaio imunoenzimáticos para a pesquisa de antígenos e anticorpos podem auxiliar na detecção da cisticercose em animais levemente infectados ou com infecção recente (PINTO et al., 2000). A padronização das reações imunológicas foi realizada utilizando-se dois grupos controle distintos. As amostras do grupo controle positivo foram provenientes de animais com alta carga parasitária e/ou que viviam sob o risco de contrair cisticercose (infecção natural); já as amostras de soro do grupo controle negativo foram provenientes de animais criados sob boas condições de higiene, sem contato com lixo ou fezes, reproduzindo as condições de criação do grupo de animais infectados experimentalmente, o qual foi constituído por animais provenientes de

criação tecnicizada que foram mantidos em instalações do Biotério da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP (FZEA-USP). Portanto, era esperado que a reatividade observada nas amostras de soro dos animais infectados experimentalmente fosse resultante somente da presença de cisticercos de *T. solium*.

5.2.1. ELISA Sanduíche e ELISA Direto para a Pesquisa de Antígenos

Muitos estudos foram realizados a fim da pesquisa de antígenos circulantes em amostras biológicas de suínos e humanos portadores de cisticercose, porém as metodologias utilizando anticorpos monoclonais contra os antígenos têm demonstrado maior reprodutibilidade e especificidade (CORREA et al., 1989; HARRISON et al., 1989; CHOROMANSKI; ESTRADA; HUH, 1990; BRANDT et al., 1992; WANG; ZHANG; GE, 1992; ERHART et al., 2002).

Foram desenvolvidas neste estudo duas metodologias para a pesquisa de antígeno circulante em soro de suínos utilizando o AcMo anti-ES-Tcra (ELISA Sanduíche e ELISA Direto).

Em concordância com vários autores, Venkatesan; Wakelin (1993) relataram que devem ser consideradas as reações inespecíficas e específicas no momento de padronização de imunoensaios e que se deve insistir na obtenção do balanço entre ambas as reações, visando minimizar a reatividade em soros negativos e, ao mesmo tempo, maximizar a diferença entre as absorbâncias obtidas nos grupos negativo e positivo. As alternativas disponíveis para atingir tal equilíbrio envolvem o emprego de: lavagens, reagentes bloqueadores, detergentes e diversas diluições de soro.

Na fase inicial da padronização do teste ELISA Sanduíche foram consideradas as possíveis interações entre os reagentes empregados, bem como as absorbâncias obtidas utilizando-se diferentes concentrações de Ag LV-Tcra e de AcMo anti-ES-Tcra para sensibilização da fase sólida (Figura 4).

As concentrações dos reagentes podem variar consideravelmente em diferentes metodologias. Foi observado que a concentração ideal de AcMo anti-ES-Tcra foi de 0,34 $\mu\text{g/mL}$ para o ELISA Sanduíche, definida pelo maior diferença obtida entre as absorbâncias das amostras controle negativo e positivo (Figura 5) e o melhor comportamento da curva de Ag LV-Tcra (Figura 6); enquanto que para o ELISA Direto a concentração de escolha foi de 1,7 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10).

A titulação em bloco, envolvendo diferentes concentrações de reagentes, conjugado e diluições da amostra, é valioso instrumento na padronização de testes. No ELISA Direto, à medida que se diluí o conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase se observa perda bastante considerável do poder discriminatório entre amostras positivas e negativas (Figura 11).

Após estabelecimento das melhores condições dos ensaios e validação dessas condições utilizando as amostras controle positivo e negativo (Figuras 9 e 13) foram ensaiadas as amostras do grupo infectado experimentalmente, avaliando agora a capacidade dos ensaios ELISA detectarem infecção branda. A análise geral dos resultados permitiu estabelecer que a melhor forma de expressá-los foi em índice de reatividade ($\text{IR} = \text{absorbância da amostra} / \text{absorbância do controle branco do ensaio}$) para o ELISA Sanduíche e em absorbância para o ELISA Direto.

Sabe-se que o limite de detecção de uma operação analítica é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada com exatidão (Chasin et al., 1998). Ao realizarmos os ensaios ELISA com diferentes concentrações de Ag LV-Tcra, obtivemos as curvas representadas em regressão linear (Figuras 8 e 12), com duas faixas de limite de detecção. Os coeficientes de determinação (r^2) para cada faixa foram melhores para o ELISA Sanduíche (0,99 e 0,79) do que para o ELISA Direto (0,70 e 0,65). A definição de duas faixas de detecção em testes quantitativos de pesquisa de antígenos é esperada, e os resultados obtidos, em parte também demonstram uma maior reprodutibilidade do ELISA Sanduíche. Esse modelo de ensaio foi aquele que também demonstrou melhores resultados no grupo com infecção branda (Figura 16 e 17). Por outro lado, o desempenho do teste ELISA Sanduíche (Figura 9) com as amostras dos grupos controle (infecção maciça) mostrou menor sensibilidade e maior especificidade que o ELISA Direto (Figura 13).

5.2.2. ELISA Indireto para a Pesquisa de Anticorpos

Tendo em vista a variação do desempenho do teste ELISA para a pesquisa de anticorpos à medida que se variam as quantidades de reagentes utilizados (MONTENEGRO et al., 1994) sobretudo antígeno, soro e conjugado, o recurso da titulação em bloco foi utilizado a fim do estabelecimento da concentração ideal de Ag LV-Tcra e conjugado anti-IgG de suíno-peroxidase que possibilitaram melhor diferenciação entre as amostras controle positivo e controle negativo (Figura 14).

Utilizando as amostras controle positivo e negativo (Figura 15) nas condições estabelecidas foram obtidos índices de sensibilidade e especificidade, respectivamente

de 93 e 100%. Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Pinto et al. (2000) e superiores aos relatados por Gonzalez et al. (1990) e Pathak et al. (1994), que encontraram taxas de sensibilidade, respectivamente de 79,2% e 70%, com especificidade respectiva de 76,2% e 93,4% quando utilizado extrato bruto de *T. solium*.

Muitos trabalhos relatam o bom desempenho do antígeno larvário de *T. crassiceps* não só para o diagnóstico da cisticercose suína (BLONDI et al., 1996; PINTO et al., 2000; NUNES et al., 2000), mas também para o diagnóstico da cisticercose humana (LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1997b).

5.3. PESQUISA DE ANTÍGENO E ANTICORPOS NO GRUPO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE (INFECÇÃO BRANDA)

A detecção de anticorpos em suínos com infecção maciça tem sido estudada e já é bem conhecida, entretanto em infecções brandas o comportamento sorológico não é claro. Os animais infectados experimentalmente que compuseram essa pesquisa formavam um grupo caracteristicamente levemente infectado. Os animais comercializados são supervisionados e há controle quanto a sua origem, portanto, é esperado que se ocorra infecção, essa seja branda.

No ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos (Figura 18), cinco animais infectados experimentalmente (71%) apresentaram resultados positivos para anticorpos ao término do experimento (t140). Sato et al. (2003) obtiveram melhor sensibilidade na detecção de anticorpos por ELISA, a partir de 30 dias após a infecção experimental em suínos com 16 ou mais cisticercos. O uso de glicoproteínas e antígenos recombinantes pode justificar melhor eficiência. Sciutto et al. (1998) também demonstraram que em

animais infectados maciçamente, antígenos e anticorpos foram detectados de 29 até 200 dias após a infecção, enquanto em suínos com infecção branda, antígenos e anticorpos foram primeiramente observados entre 61-97 dias após a infecção.

Embora o ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos tenha demonstrado 93% de sensibilidade no grupo controle positivo (animais com infecção maciça), nos animais infectados experimentalmente a positividade foi de 71% no t140 (Fig 18). Se considerarmos o emprego desse teste para triagem, poderia ser adotado o *cut off* de 0,4, o que permitiria a detecção de todos os animais infectados experimentalmente (100%) no momento do abate. Por outro lado, com esse *cut off* a especificidade do teste seria somente 62% (Figura 15) tornando o ensaio pouco interessante para a triagem de animais em matadouros. Os resultados falso positivos obrigariam a confirmação da infecção por IB, o que ocasionaria aumento dos custos e do tempo necessário para a triagem animal.

Pelos IB (18/14 e LLGP) o padrão de reatividade encontrado foi bastante heterogêneo (Tabelas 3 e 4). As bandas precocemente reconhecidas no IB LLGP foram as de 50- e 24 kDa, enquanto que no IB18/14 foi a de 14-KDa. Por outro lado, Aluja et al. (1996) relatam que as bandas de 13-, 14- e 18 kDa (IB LLGP) foram freqüentemente reconhecidas no início da infecção, e as bandas de 42-, 50- e 24 kDa durante estágios tardios (200 dias após infecção).

O IB LLGP detectou 6 animais (86%) no momento do abate (t140), mas o suíno com 11 cistos foi reagente somente em uma amostra de soro (t70). O IB 18/14 apresentou positividade de 71% nos soros dos animais infectados experimentalmente no t140, não detectando os suínos portadores de 11 e 6 cistos (Tabela 4). Adicionalmente, o suíno com 11 cistos foi reagente somente no t28 pelo ELISA Indireto

para pesquisa de anticorpos, enquanto que o animal portador de 6 cistos foi reagente a partir do t70 pela mesma metodologia (Figura 18). É possível, no caso do animal com 11 cistos, que tenha havido a formação de imunocomplexos com equivalência de antígeno-anticorpo, ou mais provavelmente, pelo excesso de antígenos, pois esse animal apresentou reatividade em todas as amostras referentes aos diferentes tempos de coleta pelo ELISA Sanduíche para pesquisa de antígeno, assim como o animal com 6 cistos (Figura 16).

Vale lembrar que nossas tentativas de utilização de agentes dissociantes e denaturantes não melhoraram os resultados na detecção de antígeno, ao contrário, esses ensaios mostraram inespecificidade (Figura 7). Possivelmente tenha havido alteração dos epítopos antigênicos pela ação do calor ou pela mudança de pH devido à adição de TCA, resultando em aumento dos IR obtidos nas amostras C- em relação ao das C+.

Nguekam et al. (2003) levantaram a hipótese de que a alta flutuação do nível de antígeno circulante pode ser resultante de variações da atividade metabólica dos cisticercos e/ou a diferenças de permeabilidade do tecido que rodeia os cistos. Estes autores também relatam que grande variação na concentração de antígeno circulante foi observada somente em suínos com pequeno número de cistos (<100). Esse resultado está de acordo com o encontrado em nosso trabalho, já que a população aqui estudada se caracterizava como portadora de infecção branda (1 a 85 cistos). Futuras e adicionais investigações na pesquisa de antígenos circulantes devem proporcionar melhores resultados para auxílio na triagem dos animais em matadouros.

A diferença de sensibilidade observada no ELISA Sanduíche para pesquisa de antígeno no grupo controle positivo (86%) e nos animais infectados experimentalmente

(57%) no momento do abate (Tabela 5) resultam provavelmente da baixa taxa de infecção observada no segundo grupo mencionado. Entretanto, devemos lembrar que este ensaio apresentou 100% de especificidade. O ELISA Direto para a pesquisa de antígeno apresentou 100% de sensibilidade no grupo dos animais com infecção maciça, mas foi não reagente para amostras de soro de todos os animais infectados experimentalmente no t140 (Figura 17), detectando apenas dois animais no t42. Esse fato provavelmente se deve a baixa concentração de antígeno presente nesse grupo (animais com infecção branda), havendo, portanto, poucos epítomos expostos ao sensibilizarmos a placa de ELISA com o soro dos suínos, além da possível adsorção de muitas outras proteínas do soro na fase sólida, dificultando a interação específica antígeno-anticorpo (AcMo anti-ES-Tcra).

Nossos resultados para o ELISA Sanduíche foram semelhantes aos obtidos por Sciutto et al. (1998), enquanto outros autores foram capazes de detectar suínos portando somente um cisto usando ELISA para pesquisa de antígeno (NGUEKAM et al., 2003).

Os resultados obtidos permitiram identificar 6 animais (86%) pela pesquisa de anticorpos utilizando IB LLGP e cinco animais (71%) pela pesquisa de anticorpos por IB 18/14, sendo que os animais não detectados por essas metodologias foram reagentes por ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígenos no t140.

5.4. ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES SOROLÓGICOS

A concordância entre os testes sorológicos utilizando-se diferentes metodologias para a pesquisa de antígeno (ELISA Sanduíche e ELISA Direto) e para a pesquisa de

anticorpos (ELISA Indireto e IB 18/14) foi avaliada com o emprego das amostras de soro dos grupos controle positivo e negativo.

A maior concordância obtida foi entre o ELISA Indireto e o IB 18/14 para anticorpos ($\kappa = 0,930$), seguida da análise de concordância entre o IB 18/14 e o ELISA Sanduíche para antígenos ($\kappa = 0,861$). Enquanto que entre as diferentes metodologias ELISA foi boa ($0,613 < \kappa < 0,789$). Somente uma amostra de soro de suíno controle positivo foi reagente para anticorpos no IB 18/14 e não reagente no ELISA Indireto (apresentando absorbância muito próxima ao *cut off*). O fato do antígeno utilizado no IB 18/14 tratar-se de antígeno purificado, composto pelas proteínas imunodominantes do Ag LV-Tcra pode justificar o ocorrido. Duas amostras de soro de suínos do grupo controle positivo foram não reagentes no ELISA Sanduíche e se apresentaram reagentes no ELISA Indireto e IB 18/14, dessa forma, provavelmente tenha ocorrido a formação de imunocomplexos, com excesso de anticorpos nesses animais, acarretando na possibilidade de detecção somente dos anticorpos. O contrário também poderia ter ocorrido, o que endossa o fato de que a associação de testes imunoenzimáticos para a pesquisa de anticorpos e de antígenos torna possível a detecção de maior número de animais.

5.5. ALGORITMO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE SUÍNA NA TRIAGEM DE ANIMAIS COM INFECÇÃO BRANDA

A análise das diferentes combinações entre as metodologias estudadas (Tabela 6) demonstrou que a associação do IB18/14 com o ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígenos permitiu a detecção de todos os animais a partir do t70, enquanto que a

utilização do IB LLGP juntamente com o ELISA Sanduíche permitiu a detecção de todos os animais a partir do t112. Além da precocidade de reatividade demonstrada pelo IB 18/14 em relação ao IB LLGP (Tabela 3), devemos ressaltar que há a dificuldade da extração das vesículas de *T. solium* pela sua forte fixação aos tecidos do suíno, favorecendo o rompimento das larvas no momento da manipulação, causando perda do material, principalmente do líquido vesicular, que é rico em proteínas de baixo peso molecular, consideradas imunodominantes (KUNZ et al, 1989; BUENO et al., 2000). Essa difícil retirada das vesículas também favorece a contaminação do material com proteínas de tecido animal, levando a obtenção de antígenos não muito adequados, especialmente para testes imunoenzimáticos em amostras de suínos (LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1997a). Dessa forma, os antígenos oriundos de líquido vesicular de *T. crassiceps* apresentam-se como promissores para o diagnóstico da cisticercose suína e humana.

A detecção de antígeno juntamente com a de anticorpos parece ser adequada especialmente para grupos com IB negativo. A aplicação desses imunoenaios em um número maior de animais sob boas condições de criação e a análise detalhada de cada caso positivo pode ajudar a definir de forma mais clara um algoritmo para aplicação de ensaios imunoenzimáticos na triagem de suínos com cisticercose.

Novos estudos sorológicos com um número maior de amostras de soro de animais com infecção branda devem ser realizados, visando a melhor avaliação da utilização de testes imunoenzimáticos para triagem desses animais em matadouros, auxiliando, dessa forma, na interrupção da transmissão do complexo teníase/cisticercose.

Apesar de ainda requererem aprimoramento, verificou-se que o uso de ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos e/ou antígenos mostrou-se mais útil que o exame clínico (apalpação da língua) e/ou *post-mortem* para a triagem de cisticercose suína em animais com infecção branda.

CONCLUSÕES

Todos os animais infectados experimentalmente estavam aparentemente saudáveis no momento do abate, passando despercebidos pelos exames convencionais utilizados na triagem em matadouros. O *post-mortem* minucioso identificou cisticercos em todos animais, variando de 1 a 85 cistos (com média de 33,7 e desvio padrão de 31,3), indicando que esse grupo pode ser classificado como de infecção branda;

1. A pesquisa de antígeno por ELISA Sanduíche permitiu a detecção de 4 animais (57%) no momento do abate. As amostras de soro do animal com 11 cisticercos foram negativas para a pesquisa de anticorpos em todos os métodos ensaiados, enquanto se mantiveram reagentes partir do t14 até o final do experimento (t140) para a pesquisa de antígenos. Nenhum animal foi detectado no momento do abate pelo ELISA Direto;
2. No momento do abate, a positividade dos testes para a pesquisa de anticorpos por ELISA Indireto e IB 18/14 foi de 71% (5 animais), enquanto que para o IB LLGP foi de 86% (6 animais). Os animais não reagentes para anticorpos foram detectados por ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígenos;
3. O IB 18/14 associado ao ELISA Sanduíche permitiu a detecção de todos os animais a partir do t70, enquanto que o IB LLGP associado ao ELISA Sanduíche permitiu a detecção de todos os animais a partir do t112;

Algoritmo para a triagem da cisticercose suína em animais com infecção branda:

REFERÊNCIAS

- AGAPEGEV, S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arq Neuropsiquiatr**, São Paulo, v. 61 (3-B), p. 822-828, 2003.
- ALLAN, J.C., AVILLA, G., GARCÍA-NOVAL, J., FLISSER, A., CRAIG, P.S. Immunodiagnosis of taeniosis by coproantigen detection. **Parasitology**, London, v. 101, p. 473-477, 1990.
- ALLAN, J.C., VELASQUEZ-TOHOM, M., GARCIA, J.N., TORRES, R.A., YURRITA, P.F., DE MATA, F., ALFARO, H.S., CRAIG, P.S. Epidemiology of intestinal taeniasis in four rural Guatemalan communities. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v.90, p. 157-165, 1996a.
- ALLAN, J.C., VELASQUEZ-TOHOM, M., TORRES, R.A., YURRITA, P., GARCIA, J.N. Field trial of diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by coproantigen enzyme linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 54, n.4, p. 352-356, 1996b.
- ALLAN, J.C., VELASQUEZ-TOHOM, M., FLETES, C., TORRES, R.A., LOPEZ, G.V., YURRITA, P., SOTO DE ALFARO, H., RIVERA, A., GARCIA, J.N. Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 91, n.5, p. 595-598, 1997.
- ALLAN, J.C., CRAIG, P.S. Coproantigens in taeniasis and echinococcosis. **Parasitol Int.**, Amsterdam, v.55, p.S75-S80, 2006.
- ALUJA, A.S., VILLALOBOS, A.N.M., PLANCARTE, A., RODARTE, L.E., HERNÁNDEZ, M., SCIUTO, E. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: Characteristics of the infection and antibody response. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 61, n.1-2, p. 49-59, 1996.
- ARRUDA, W.O., CAMARGO, N.J., COELHO, R.C. Neurocysticercosis: an epidemiological survey in two small rural communities. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 48, n. 4, p.419-424, 1990.
- BAYER, E.A., WILCHECK, M., SKUTELSKY, E. Affinity cytochemistry: The localization of lectin and antibody receptors on erythrocytes via the avidin-biotin complex. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 68, n.2, p. 240-244, 1976.
- BAYER, E.A., WILCHEK, M. The use of avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. **Methods Biochem. Anal.**, New York, v. 26, p. 1-45, 1980.
-

*De acordo com a norma NBR6023/200 preconizada pela Associação Brasileira de normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2004.

- 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* metacestodes. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam v. 64, n.4, p. 261-266,1996.
- BOA, M.E., KASSUKU, A.A., WILLINGHAM III, A.L., KEYYU, J.D., PHIRI, I.K., NANSEN, P. Distribution and density of cysticerci of *Taenia solium* by muscle groups and organs in naturally infected local finished pigs in Tanzania. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.106, n.2, p. 155-164, 2002.
- BRANDT, J.R.A., GEERTS, S., DE DEKEN, R., KUMAR, V., CULEMANS, F., BRIJS, L., FALLA, N. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **Int. J. Parasitol.**, Oxford., v. 22, n. 4. p. 471-477, 1992.
- BRASIL. Leis e decretos. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Aprovado pelo decreto 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelo decreto 1.255 de 25 de junho de 1962. Ministério da Agricultura Brasília,.Distrito Federal,1980.
- BUENO, E.C. **Neurocysticercose: avaliação da resposta imune humoral nas diferentes fases evolutivas da doença pelo ELISA e imunoblot com antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps*.** 1999. 144f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- 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. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.1, p.146-151, 2000.
- CARPIO, A. Neurocysticercosis: an update. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v.2, n.12, p.751-762, 2002.
- CARRADA-BRAVO, T. Taeniasis-cisticercosis como problema de salud pública. **Bol. Méd. Hosp. Infant.Mex**, México, v. 44, n.7, p.427-434, 1987.
- CHANG-YUAN, W.,HONG-HUA,Z, LING-YUN-, G. A MAb-Based ELISA for detection circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. **Hybridoma**, New York, v.11, p. 825-827, 1992.
- CHAPMAN, A., VALLEJO, V., MOSSIE, K.G., ORTIZ, D., AGABIAN, N., FLISSER, A. Isolation and acharacterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium*

and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n.5, p.1283-1288, 1995.

CHASIN, A.A.V., NASCIMENTO, E.S., RIBEIRO-NETO, L.M., SIQUEIRA, M.E.P.B., ANDRAUS, M.H. SALVADORI, M.C., FERNÍCOLA, N.A.G., GORNI, R., SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

CHERMETTE, R., BUSSIÉRAS, J., MARIONNEAU, J., BOYER, E., ROUBIN, C., PROPHETTE, P., MAILLARD, H., FABIANI, B. Invasive cysticercosis due to *Taenia crassiceps* in an AIDS patient. **Bull Acad. Natl. Med.**, Paris, v.179, n.4, p.777-783, 1995.

CHIMELLI, L., LOVALHO, A.F., TAKAYANAGUI, O.M. Neurocisticercose. Contribuição da necrópsia na consolidação da notificação compulsória em Ribeirão Preto SP. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v.56, p.577-584, 1998.

CORREA, D., SANDOVAL, M.A., HARRISON, L.J., PARKHOUSE, R.M., PLANCARTE, A., MEZA-LUCAS, A., FLISSER, A. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 83, n.6, p. 814-816, 1989.

CHOROMANSKI, L., ESTRADA, JJ., KUHN, R.E. Detection of antigens of larval *Taenia solium* in the cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA. **J. Parasitol.**, Washington, v.76, n.1, p. 69-73, 1990.

CÔRTEZ, J.A. Epidemiologia do processo teníase humana-cisticercose. **Comum. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo**, São Paulo, v.8, n.2, p.31-41, 1984.

CRAIG, P.S., ROGAN, M.T., ALLAN, J.C. Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. **Adv Parasitol.**, London, v.38, p.169-250, 1996.

CRAIG, P.S., PAWLOWSKI, Z. **Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis.** An emergent and global problem. Amsterdam: IOS, 2002. p.395. (NATO Science Series: Life and Behavioural Sciences, v.341)

Cysticercosis Working Group in Peru (GWPG). The marketing of cysticercotic pigs in the sierra of Peru. **Bull. W.H.O.**, Geneva, v. 71, n.2, p.223-228, 1993.

DAWSON, J.B., TRAPP, R.G., MCGRAW, A. In: _____. **Bioestatística Básica e Clínica.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2001, cap. 5, p.102.

- DIAZ-CAMACHO, S., CANDIL, A., SUATE, V., ZAZUETA, M.L., FELIX, M., LOZANO, R., WILLMS, K. Epidemiological study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.45, n.4, p. 522-531, 1991.
- DIAZ, J.F., VERASTEGUI, M., GILMAN, R.H., TSANG, V.C.W., PILCHER, J.B., GALLO, C., GARCIA, H.H., TORRES, P., MONTENEGRO, T., MIRANDA, E., THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP OF PERU. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison an antibody-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.46, n.5, p.610-615, 1992.
- DORNY, P., VERCAMMEN, F., BRANDT, J., VANSTEENKISTE, W., BERKVEN, D., GEERTS, S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.88, n.1-2, p. 43-49, 2000.
- ERHART, A., DORNY, P., VAN DE, N., VIEN, H.V., TACH, D.C., TOAN, N.D., CONG LE, D., GEERTS, S., SPEIBROECK, N., BERKVEN, D., BRANDT, J. *Taenia solium* cysticercosis in a village in northern Vietnam: seroprevalence study using an ELISA for detection circulating antigen. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.96, n.34, p.270-272, 2002.
- ESCOBAR, A., NIETO, D. Cysticercosis. In: MINKLER, J. **Pathology of the Nervous System**. 3^a ed. New York: Mac Graw-Hill Book, 1972, p. 2507-2515.
- ESPÍNDOLA, N. M., VAZ, A. J., PARDINI, A. X., FERNANDES, I. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v.96, n.4, p.361-368, 2002.
- ESPÍNDOLA, N.M. **Caracterização de antígenos de cisticercos e sua aplicação para o diagnóstico da cisticercose humana**. 2004. 95f. Dissertação de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- ESPÍNDOLA, N.M., IHA, A. I., 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 *T. crassiceps* Cysticercus Antigens Obtained by Immunoaffinity Chromatography. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.43, n.7, p.3178-3184, 2005.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. All databases. Agriculture and food trade: live animals. Disponível em: <http://apps.fao.org>. Acesso em: 25 nov. 2005.

- FLISSER, A., MADRAZO, I., GONZALEZ, D., SANDOVAL, M., RODRIGUEZ-CARBAJAL, J., DE-DIOS, J. Comparative analysis of human and porcine neurocysticercosis by computed tomography. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, n.82, v.5, p.739-742, 1988.
- FLISSER, A. Taeniasis-Cysticercosis: an introduction. **Shoutheast Asian J. Trop. Med. Public Health**, Bangkok, v.22, p.233-235, 1991.
- FLISSER, A., PLANCARTE, A., CORREA, D. Diagnóstico, tratamiento y mecanismos de evasión inmune de la cisticercosis por larvas de *Taenia solium* en seres humanos y cerdos. **Rev. Assoc. Guatemalt. Med. Trop.**, Cidade da Guatemala, v.6, p.43-54, 1991.
- FLISSER, A., MADRAZO, I., PLANCARTE, A., SCHANTZ, P., ALLAN, J., CRAIG, P., SARTI, E. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after a single taenicial dose of praziquantel. **Lancet**, London, v.342, p.748, 1994.
- FLISSER, A. Epidemiological studies of taenioses and cysticercosis in Latin America. In: CRAIG, P., PALOWSKI, Z. **Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis an emergent and global problem**. Amsterdam: IOS, 2002. p. 3-12. (NATO Science Series: Life and Behavioural Sciences, v.341)
- FLISSER, A., SARTI, E., LIGHTOWLERS, M., SCHANTZ, P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. **Acta Trop.**, Basel, v.87, p.43-51, 2003.
- FREEMAN, R. S. Studies of the biology of *Taenia crassiceps*. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.40, p.969-990, 1962.
- FREITAS, M.G. Teníase e cisticercose. In: _____. **Helmintologia Veterinária**. 2ª ed. Belo Horizonte: Rabelo e Brasil, 1980, p. 112-117.
- GARCIA, H.H., MARTINEZ, M., GILMAN, R., HERRERA, G., TSANG, V.C., PILCHER, J.B., DIAZ, F., VERASTEGUI, M., GALLO, C., PORRAS, M. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. **Lancet**, London, v.338, p.549-551, 1991.
- GARCIA, H.H., DEL BRUTO, O.H. *Taenia solium* cysticercosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.14, n.1, p.97-119, 2000.
- GARCIA, H.H., GONZALEZ, A.E., EVANS, C.A.W., GILMAN, R.H., THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. *Taenia solium* cysticercosis. **Lancet**, London, v.361, n.16, p.547-556, 2003.
- GEERTS, S., ZOLLI, A., WILLINGHAM, L., BRANDT, J., DORNY, P., PREUX, T.M. *Taenia solium* cysticercosis in Africa: an under-recognized problem. In: CRAIG, P.S., PAWLOWSKI, Z. **Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis. An emergent and global problem**. Amsterdam: IOS, 2002. p.395. (NATO Science Series: Life and Behavioural Sciences, v.341).

- GILMAN R., GARCIA, H.H., GONZALEZ, A.E., DUNLEAVY, M., VERASTEGUI, M., EVANS, C., AND THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU Short cuts to development: methods to control the transmission of cysticercosis in developing countries. In: GARCIA H.H., MARTINEZ S.M. *Taenia solium taeniasis/cysticercosis*. Lima: Ed. Universo, 2002, p.313–326.
- GLASS, W.F., BRIDGGS, R.C., HNILICA, L.S. Use of lectins for detection of eletrophoretically separated glicoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.*, New York, v.115, p.219-224, 1981.
- GONZALEZ, D., RODRIGUEZ-CARBAJAL, J., ALUJA, A., FLISSER, A Cerebral cysticercosis in pigs studied by Computed Tomography and Necropsy. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.26, n.1-2, p.55-69, 1987.
- GONZALEZ, A.E., CAMA, V., GILMAN, R.H., TSANG, V.C., PILCHER, J.B., CHAVERA, A., CASTRO, M., MONTENEGRO, T., VERASTEGUI, M., MIRANDA, E., BAZALAR, H. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.43, n.2, p.194-199, 1990.
- GONZALEZ, A.E., GARCIA, H.H., GILMAN, R.H., TSANG, V.C.W., CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Control of *Taenia solium*. *Acta Trop.*, Basel, n.87,v.1, p.103-109, 2003.
- GUESDON, J.L., TERNYNCK, T., ARAMEAS, S. Polyacrilamide-agarose beads for the preparation of effective immunoabsorbents. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.11, p.129-133, 1979.
- HARRISON, L.J.S., JOSHUA, G.W.P., WRIGHT, S.H., PARKHOUSE, R.M.E. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.*, Oxford, v.11, n.4, p.351-370, 1989.
- HUISA, B.N., MENACHO, L.A., RODRIGUEZ, S., BUSTOS, J.A., GILMAN, R.H., TSANG, V.C., GONZALEZ, A.E., GARCIA, H.H., CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Taeniasis and cysticercosis in housemaids working in affluent neighborhoods in Lima, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.73, n.3, p. 496-500, 2005.
- KEILBACH, N.M., de ALUJA, A.S., SARTI-GUTIERREZ, E. A programme to control taeniasis-cysticercosis (*T. solium*): experiences in a Mexican village. *Acta Leiden.*, Leiden, v.57, n.2, p.181-189, 1989.

- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, London, v.256, p 495-497, 1975.
- KOLLEF, M.H., SCHUSTER, D.P. Predicting intensive care unit outcome with scoring systems. Underlying concepts and principles. **Crit. Care Clin.**, Philadelphia, v.10, n.1, p. 1-18, 1994.
- KUNZ, J., KALINNA, 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. **Zentrabl. Bakteriол.**, Stuttgart, v. 271, n. 4, p. 510-520, 1989.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LARRALDE, C., SOTELO, J., MONTOYA, R.M., PALENGIA, G. PADILLA, A., GOVEZENSKY, T., DIAS, M.L., SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.114, n.9, p.926-928, 1990.
- LEKULE, F.P., KYVSGARD, N.C. Improving pig husbandry in tropical resource-poor communities and its potential to reduce risk of porcine cysticercosis. **Acta Trop.**, Basel, v. 87, n.1, p.111-117, 2003.
- LIGHTOWLERS, M.W. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v.29, n.6, p.811-817, 1999.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, n.1, p.265-275, 1951.
- MACIEL, G.D., PAIM, G.V. Nosographical data obtained at the slaughterhouse and its importance for public health. **Arq. Fac. Hig. Saude Publica**, São Paulo, v.20, n.2, p.241-249, 1966.
- MEZA, N.W., ROSSI, N.E., GALEAZZI, T.N., SANCHEZ, N.M., COLMENARES, F.I., MEDINA, O.D., UZCATEGUI, N.L., ALFONZO, N., ARANGO, C., URDANETA, H. Cysticercosis in chronic psychiatric inpatients from a Venezuelan community. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.73, n.3, p.504-9, 2005.
- MOLINARI, J.L., MEZA, R., SUÁREZ, B., PALACIOS, S., TATO, P. *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercus. **Exp. Parasitol.**, New York, v.55, n.3, p.340-357, 1983.
- MONTENEGRO, T., GILMAN, R.H., CASTILHO, R., TSANG, V., BRANDT, J., GUEVARA, A., SANABRIA, H., VERASTEGUI, M., STERLING, C., MIRANDA, E.

- The diagnostic importance of species specific and cross-reactive components of *Taenia solium*, *Equinococcus granulosus*, and *Hymenoleps nana*. **Rev. Inst. Med.Trop.**, São Paulo, v.36, n.4, p.327-34, 1994.
- NASCIMENTO, E.J., COSTA, O., GUIMARES, M.P., TAVARES, C.A.P. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.45, n.1-2, p.127-137, 1995.
- NASH, T.E., NEVA, F.A. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. **New Engl. J. Med.**, Boston, v.311, n.23, p.1492-1496, 1984.
- NGOWI, H.A., KASSUKU, A.A., MAEDA, G.E., BOA, M.E., WILLINGHAM, A.L. A slaughter slab survey for extra-intestinal porcine helminth infection in northern Tanzania. **Trop. Anim. Health Prod.**, Boston, v.36, n.4, p.335-340, 2004.
- 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. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.111, n.4, p.323-332, 2003.
- NICOLETTI, A., BARTOLONI, A., SOFIA, V., BARTALESI, F., CHAVEZ, J.R., OSINAGA, R., PARADISI, F., DUMAS, J.L., TSANG, V.C., REGGIO, A., HALL, A.J. Epilepsy and neurocysticercosis in rural Bolivia: a population-based survey. **Epilepsia**, Minneapolis, v.46, n.7, p.1127-32, 2005.
- NIETO, C. Cysticercosis of the central nervous system. Diagnosis by means of spinal fluid complement fixation test. **Neurology**, Minneapolis, v.6, n.10, p.725 , 1982.
- 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. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.93, n.2, p.135-140, 2000.
- ONAH, D.N., CHIEJINA, S.N. *Taenia solium* cysticercosis and human taeniasis in the Nsukka area of Enugu State, Nigeria. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v.89, n.4, p.399-407, 1995.
- PARDINI, A.X., VAZ, A.J., MACHADO, L.R., LIVRAMENTO, J.A. Cysticercus Antigens in Cerebrospinal Fluid Samples from Patients with Neurocysticercosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.9, p.3368-3372, 2001.
- PARIJA, M., BISWAS, R., HARISH, B.N., PARIJA, S.C. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. **Acta Trop.**, Basel, v.92, n.3, p.253-260, 2004.
- PATHAK, K.M.L., GAUR, S.N.S. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.34, n.4, p.353-356 , 1990.

- PATHAK, K.M., ALLAN, J.C., ERSFELD, K., CRAIG, P.S. A western blot and ELISA assay for the diagnosis of *Taenia solium* infection in pigs. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.53, n.3-4, p.209-217, 1994.
- PAWLOWSKI, Z.S., SCHULTZ, M.G. Taeniasis and cysticercosis (*Taenia saginata*). **Adv. Parasitol.**, London, v.10, p.269-343, 1972.
- PESSOA, S.B., MARTINS, A.M. Cisticercose. In: PESSOA, S.B., AMÍLCAR, V.M. **Parasitologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1988, p.448-464.
- PHIRI, I.K., DORNY, P., GABRIEL, S., WILLINGHAM III, A.L., SPEYBROECK, N., VERCRUYSSSE, J. The prevalence of porcine cysticercosis in Eastern and Southern provinces of Zambia. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.108, p.31-39, 2002.
- PHIRI, I.K., NGOWI, H., AFONSO, S.M.S., MATENGA, E., BOA, M., MUKARATIRWA, S., GITHIGIA, S.M., SAIMO, M.K., SIKASUNGUE, C.S., MAINGI, N., LUBERGA, G.W., KASSUBU, A., MICHAEL, L.M., SIZIYA, S., KRECEK, R.C., NOORMAHOMED, E., VILHENA, M., DORNY, P., WILLINGHAM III, A.L. The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in eastern and southern Africa as a serious agricultural problem and public health risk. **Acta Trop.**, Basel, v.87, p.13-23, 2003.
- 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. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 88, n.1-2, p.127-130, 2000.
- RAJSHEKHAR, V. *Taenia solium* cysticercosis: epidemiology and impact in Asia. **Acta Trop.**, Basel, v.87, p.53-60, 2003.
- RAMIREZ-BON, E., MERCHANT, M.T., GONZALEZ-DEL PIEGO, M., CANEDO, L. Ultrastructure of the bladder wall of metacestode of *Taenia solium*. In: FLISSER, A., WILLMS, K., LACLETTE, C., RIDAURA, C., BELTRAN, F. **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives**. New York: Academic Press, 1982, p.1-7.
- RAMOS JÚNIOR, A.N., MACEDO, H.W., RODRIGUES, M.C., PERALTA, R.H., MACEDO, N.A., MARQUES, M.D.A. C., ALVES, J.R., PAES, A.D.E.N., CASTRO, J.A., ARAUJO, A.J., PERALTA, J.M. Seroepidemiological survey of human cysticercosis in a municipality of Piauí State, Northeast Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.20, n.6, p.1545-55, 2004.
- REY, L. Cisticercose humana. In: _____. **Parasitologia Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001, p.510-519.
- RODRIGUEZ-CANUL, R., ALLAN, J.C., DOMINGUEZ, L.L., VILLEGAS, S., COB, L., RODRIGUEZ, R.I., COOK, A.J., WILLIAMS, J., ARGAEZ, F., CRAIG, P.S. Application of an immunoassay to determine risk factors associated with porcine

- cysticercosis in rural areas of Yucatan, Mexico. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.79, n.2, p.165-180, 1998.
- RODRIGUEZ-HIDALGO, R. BENÍTZ-ORTIZ, W., DORNY, P. GEERTS, S. GEYSEN, D., RON-ROMÁN, J., PROAÑO-PÉREZ, F., CHÁVEZ-LARREA, M.A., BARRIONUERVO-SAMANIEGO, M., CELI-FRAZO, M., VIZCAÍNO-ORDOÑEZ, L., BRANDT, J. Taeniosis-cysticercosis in man and animals in the Sierra of Northern Ecuador. **Vet. Parasitol**, Amsterdam, v.118, n.1-2, p. 51-60, 2003.
- RUTTIMANN, E.U. Statistical approaches to development and validation of predictive instruments. **Crit. Care Clin.**, Filadélfia, v.10, p.19-35, 1994.
- 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. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.61, p.268-268, 2001.
- SAKO, Y., ITO, A. Recent advances in serodiagnosis for cysticercosis. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, Bangkok, v.32, n.2, p.98-104, 2001.
- SANTAMARIA, E., PLANCARTE, A., ALUJA, A. The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: Immune response and efficiency of establishment. **J. Parasitol.**, Oxford, v.88, p.69-71, 2002.
- SARTI, E., SCHANTZ, P., LARA, R., GÓMEZ, H., FLISSER, A. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Liverpool, v.39,n.3, p.194-198,1988.
- SARTI, E., SCHANTZ, P.M., PLANCARTE, A., WILSON, M., GUTIÉRREZ, O.I., I.O., LÓPEZ, A.S., ROBERT, A., FLISSER, A. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.88, p.49-52, 1992.
- SARTI E, SCHANTZ PM, PLANCARTE A, WILSON M, GUTIERREZ OI, AGUILERA J, ROBERTS J, FLISSER A. Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan state, Mexico. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Georgia, v.88, n.1, p.49-52, 1994a.
- SARTI, E., SCHANTZ, P.M., PLANCARTE, A., WILSON, M., GUTIÉRREZ, O.I., I.O., LÓPEZ, A.S., ROBERT, A., FLISSER, A. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** , Georgia, v.88, p.49-52, 1994b.
- SARTI, E., FLISSER, A., SCHANTZ, P., GLEIZER, M., LOYA,M., PLANCARTE, A., AVILA, G., ALLAN, J., CRAIG, P, BRONFMAN, M.,WIJEYARANTE, P. Development and evaluation of a health education against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, Baltimore, v.56, n.2, p.127-132, 1997.

- SARTI, E., SCHANTZ, P.M., AVILA, G., AMBROSIO, J., MEDINA-SANTILLÁN, R., FLISSER, A. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Georgia, v.94, p.85-89, 2000.
- SATO, M.O., YAMASAKI, H., SAKO, Y., NAKAO, M., NAKAYA, K., PLANCARTE, A., KASSUKU, A.A., DORNY, P., GEERTS, S., BENITEZ-ORTIZ, W., HASHIGUCHI, Y., ITO, A. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.111, n.4, p.309-322, 2003.
- SCHANTZ, P.M., MOORE, A.C., MUNÓZ, J.L., HARTMAN, B.J., SCHAEFER, J.A., ARON, A.M., PERSAUD, D., SARTI, E., WILSON, M., FLISSER, A. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. **N Engl J. Med.**, Boston, v.327, n.10, p.692-695, 1992.
- SCHANTZ, P.M., CRUZ, M., SARTI, E., PAELOESKI, Z. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. **Bull. Pan. Health Org.**, Washington, v.27, n.4, p.307-403, 1993.
- SCHANTZ, P.M., WILKINS, P.P., TSANG, V.C. A case of neurocysticercosis in a traveler to Latin America. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.60, n.2, p.255-6, 1999.
- SCHENONE, H., VILLAROEL, F., ROJAS, A., RAMÍREZ, R. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In:___ FLISSER, A., WILLMS, K., LACLETTE, C., RIDAURA, C., BELTRÁN, F. **Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives**. New York: Academic Press, 1982, p.25-38.
- SCIUTTO, E., MARTINEZ, J.J., VILLALOBOS, N.M., HERNANDEZ, M., HOSE, M.V., BELTRAN, C., RODARTE, F., FLORES, I., BOBADILLA, J.R., FRAGOSO, G., PARKHOUSE, M.E., HARRISON, L.J., ALUJA, A.S. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *taenia solium* cysticercosis in rural pigs. **Vet Parasitol.**, Amsterdam, v.79, n.4, p.299-313, 1998.
- SILVA-VERGARA, M. L., VIEIRA, C. O., CASTRO, J.H., MICHELETTI, L.G., OTANO, A.S., FRANQUINI JUNIOR, J., CABRAL, M., LEBOREIRO, A., MARQUES, J.O., SOUZA, W.F.; CRUZ, J.M.C., PRATA, A. Neurologic and laboratory findings in a population of an endemic area for taeniasis-cysticercosis, Lagamar, MG, Brazil (1992-1993). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v.36, n.4, p.335-42, 1994.
- SIMANJUNTAK, G.M., MARGONO, S.S., OKAMOTO, M., ITO, A. Taeniasis/cysticercosis in Indonésia as an emerging disease. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v. 13, p.321-323, 1997.

- SPINA-FRANÇA, A., LIVRAMENTO, J.A., BACHESCHI, L.A., GARCIA-LOPES, Cerebrospinal fluid immunoglobulins in cysticercosis of the central nervous system. **Arq. Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.34, n.1, p.40-45, 1976.
- SPINA-FRANÇA, A., LIVRAMENTO, J.A., MACHADO, L.R. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. **Arq. Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.51, n.1, p.16-20, 1993.
- 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., CASTRO E SILVA, A.A., SANTIAGO, R.C., ODASHIMA, N.S., TERRA, V.C., TAKAYANAGUI, A.M. Compulsory notification of cysticercosis in Ribeirão Preto- SP, Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v.54, n.4, p.557-64, 1996.
- THEIS, J.H., CLEARY, M., SYVANEN, M., GILSON, A., SWIFT, P., BANKS, J., JOHNSON, E. DNA- confirmed *Taenia solium* cysticercosis in black bears (*Ursus americanus*) from California. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.55, n.4, p.456-458, 1996.
- TOWBIN, H., STAEGELIN, T. GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.76, p.4350-4352, 1979.
- 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*). **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.159, n.1, p.50-59, 1989.
- TSANG, V., PILCHER, A.J., ZHOW, W., BOYER, E.A., KAMANGOMAN, I.P.E. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.29, p.69-78, 1991.
- VAN KERCKHOVEN, I., VANSTEENKISTE, W., CLAES, M., GEERTS, S., BRANDT, J. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.76, p.269-274, 1998.
- VAZ, A.J., NAKAMURA, P.M., BARRETO, C.C., FERREIRA, A.W., LIVRAMENTO, J.A., Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: use of heterologous antigenic particles (*Cysticercus longicollis*) in indirect immunofluorescence test. **Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.**, Tokyo, v.8., p157-161, 1997a.

- 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.**, Baltimore, v.57, n.3, p.354-357, 1997b.
- VAZ, A. J., LIVRAMENTO, J. A. Neurocysticercose. In: FERREIRA, A. W., AVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001, p.316-321.
- VENKATESAN, P., WAKELIN, D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies, and ELISAs. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.9, n.6, p.228-32, 1993.
- VERASTEGUI, M., GONZALEZ, A., GILMAN, R.H., GAVIDIA, C., FALCON, N., BERNAL, T., GARCIA, H.H., CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Experimental infection model of *Taenia solium* cysticercosis in swine. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.94, p. 33-44, 2000.
- VERASTEGUI, M., GILMAN, R.H., GARCIA, H.H., GONZALEZ, A.E., ARANA, Y., JERI, C., TUERO, I., GRAVIDIA, I.T., CAVIDIA, C.M., LEVINE, M, TSANG, V.C.W., THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Prevalence of antibodies to unique *Taenia solium* oncosphere antigens in taeniasis and human and porcine cysticercosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.69, n.4, p.438-444, 2003.
- VILLA, M.F.G. Situação epidemiológica do complexo teníase/cisticercose como problema de Saúde Pública no Brasil. **Hig. Alim.**, São Paulo, v.9, n.36, p.8-11, 1995.
- WANDRA, T., DEPARY, A.A., SUTISNA, P., MARGONO, S.S., SUROSO, T., OKAMOTO, M., CRAIG, P.S., ITO, A. Taeniasis and cysticercosis in Bali and North Sumatra, Indonesia. **Parasitol Int.**, Amsterdam, v.55, p.155-60, 2005.
- WANG, C.Y., ZHANG, H.H., GE, L.Y. A Mab-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. **Hybridoma**, New York, v.11, p.825-827, 1992.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), The cysticercus working group in Peru. The marketing of cysticercosis pigs in Sierra of Peru. **Bull. W.H.O.**, Geneva, v.71, n.2, p.223-228, 1993.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Control of neurocysticercosis. **Provisional agenda of the 55 World Health Assembly**, Geneva, p.1-3, 2002.
- ZOLI, A, SHEY-NJILA, O., ASSANA, E., NGUEKAM, A., DORNY, P., BRANDT, J., GEERTS, S. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in western and central Africa. **Acta Trop.**, Basel, v.87, p.35-42, 2003.

ANEXOS

ANEXO I - SOLUÇÕES E REAGENTES

Para pesquisa de antígeno circulante por ELISA Sanduíche e Direto

- a. *Solução Salina*: NaCl 0,15M (Merck, Darmstadt, Alemanha) em água destilada.
- b. *Solução salina tamponada com fosfatos 0,01M pH 7,2 (PBS)*: Na_2HPO_4 0,0075M (Merck, Darmstadt, Alemanha) NaH_2PO_4 0,025M (Merck SA Industrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil) e NaCl 0,14M (Merck) em água destilada.
- c. *Solução de lavagem*: salina com 0,05% Tween 20 (USB Corporation, Cleveland, USA).
- d. *Solução bloqueadora*: albumina bovina a 3% (BSA, Sigma, St. Louis, EUA) em tampão PBS Tween a 0,05%, pré-oxidada com metaperiodato de sódio a 10 mM (Sigma, St. Louis, EUA) durante 6 horas a temperatura ambiente e dialisada em PBS.
- e. *Solução diluente*: solução de BSA (Sigma) a 1% em PBS pH 7,2 com 0,05% Tween 20 (USB).
- f. *Solução cromógena OPD* (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA): 1 pastilha de OPD em 50 mL de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 1 μL de H_2O_2 (Merck, Darmstadt, Alemanha) por mL de solução cromógena
- g. *Solução de tampão citrato-fosfato pH 5,0*: Na_2HPO_4 0,1M (Merck) e $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01 M (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Para pesquisa de anticorpos por ELISA Indireto

- a. *Solução tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6*: Na_2CO_3 0,1M (Merck, Darmstadt, Alemanha) e NaHCO_3 0,1M (Merck, Darmstadt, Alemanha) em água destilada.
- b. *Solução de lavagem*: PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 (USB Co.).
- c. *Solução bloqueadora*: solução de leite (leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% Tween 20 (USB Co.).

- d. *Solução diluente*: solução de leite a 1% (Molico) em PBS pH 7,2 com 0,05% Tween 20 (USB Co.).
- e. *Solução cromógena OPD* (Sigma Chem. Co.): 1 pastilha de OPD em 50 mL de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 1 μ L de H₂O₂ (Merck) por mL de solução cromógena

Para SDS-PAGE

- a. *Solução tampão de amostra 5 vezes concentrado*: Tris-hidroximetilaminoetano (Tris) – HCl 0,06M pH 6,8 (USB Corporation, Cleveland, EUA), SDS 2% (USB Corporation, Cleveland, EUA), glicerol 25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 2-mercaptoetanol Tipo I 0,014M (Sigma, St. Louis, EUA), e azul de bromofenol 0,1% (Sigma, St. Louis, USA) em água destilada.
- b. *Gel de separação 15%*: 15% acrilamida (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) respectivamente e bis-acrilamida 0,2% (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) todos em solução tamponada Tris-HCl 1,5M pH 8,8 com SDS 0,1% (USB Co.).
- c. *Gel de empilhamento de 5%*: acrilamida 5% (Pharmacia Biotech) e bis-acrilamida 0,1%(Pharmacia Biotech) em Tris-HCl 0,5M (USB Co.) pH 6,8, contendo 0,25% de SDS (USB Co.).
- d. *Solução tampão de corrida pH 8,3*: Tris 0,025M (USB Corporation, Cleveland, USA), glicina 0,129M (USB Corporation, Cleveland, USA) e SDS 0,1% (USB Co.) em água destilada.

Para Transferência Eletroforética

- a. *Solução tamponada de transferência pH 8,3*: Tris 0,025M (USB Co.), glicina 0,192 M (USB Co.) e metanol 20% (Merck, Darmstadt, Alemanha) em água destilada.
- b. *Solução corante Ponceau*: Ponceau-S 0,5% (USB Corporation, Cleveland, USA) em água destilada.

Para Immunoblot

- a. *Solução de lavagem*: PBS pH 7,2 com 0,3% de Tween 20 (PBS-T).

- b.** *Tampão de bloqueio:* solução de leite (Molico) a 5% em PBS pH 7,2 com 0,3% Tween 20 (USB Co.).
- c.** *Diluyente de amostra e conjugado:* solução de leite (Molico) a 1% em PBS pH 7,2 com 0,3% Tween 20 (USB Co.).
- d.** *Tampão diluyente de substrato 4-cloro-naftol:* Tris-HCl 0,1M (USB Corporation, Cleveland, EUA).
- e.** *Solução cromógena 4-cloro-naftol:* 4-cloro-naftol 0,05% (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA) em tris-salina tamponada pH7,4 0,01M (Tris 0,01M e NaCl 0,15M) com metanol 16,6% (Merck) e H₂O₂ 0,6% (Merck).
- f.** *Solução Cromógena de 3,3 – diaminobenzidina:* diaminobenzidina 0,017% (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA) e H₂O₂ 5% (Merck) em PBS pH 7,2.

ANEXO II

Distribuição dos cisticercos por órgãos e regiões em suínos experimentalmente infectados.

Órgão ou Região	Suínos							Total por órgão	% por 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	3,8
Língua	5	0	0	0	1	3	0	9	3,8
Masseter	0	0	0	2	1	7	4	14	5,9
Região Cervical	0	0	0	0	0	2	0	2	0,8
Região Esofágica	0	0	0	0	0	0	1	1	0,4
Membro Dianteiro	13	0	3	3	4	28	7	58	24,4
Membro Traseiro	7	1	1	4	8	32	15	68	28,6
Região Dorsal	18	0	0	2	6	9	12	47	19,7
Região da Nuca	2	0	1	0	2	0	1	8	3,4
Região Maxilar	2	0	0	0	0	0	0	2	0,8
Total por animal	60	1	6	11	26	85	47	238	100

ANEXO III

Resultados dos ELISA Sanduíche e ELISA Direto para pesquisa de antígeno e do ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos em amostras de soro de suínos do grupo controle positivo. Os resultados do ELISA Sanduíche estão expressos em índice de reatividade, enquanto que os do ELISA Direto e do ELISA Indireto estão em absorbância.

Amostras Controle Positivo	ELISA		
	Indireto	Sanduíche	Direto
16	1,050	2,650	0,564
17	0,655	1,660	0,703
18	0,557	2,590	0,670
19	1,369	2,650	0,509
20	0,969	2,950	0,646
21	1,073	2,690	0,558
22	0,654	2,760	0,484
23	0,851	2,280	0,832
24	1,692	2,230	0,699
25	0,685	2,670	0,526
26	2,146	2,280	0,942
27	1,701	2,690	0,484
28	2,456	2,390	1,055
29	1,944	2,070	0,563

ANEXO IV

Resultados dos ELISA Sanduíche e ELISA Direto para pesquisa de antígeno e do ELISA Indireto para pesquisa de anticorpo em amostras de soro de suínos do grupo controle negativo. Os resultados do ELISA Sanduíche estão expressos em índice de reatividade, enquanto que os do ELISA Direto e do ELISA Indireto estão em absorbância.

Amostras Controle Negativo	ELISA		
	Indireto	Sanduíche	Direto
1	0,521	1,870	0,329
2	0,447	2,060	0,560
3	0,414	1,360	0,386
4	0,339	1,060	0,360
5	0,534	1,080	0,378
6	0,419	1,780	0,364
7	0,378	0,890	0,289
8	0,340	1,620	0,347
9	0,373	1,280	0,497
10	0,520	1,140	0,470
11	0,457	1,590	0,480
12	0,259	1,300	0,234
13	0,303	1,320	0,299
14	0,515	1,100	0,332
15	0,312	1,210	0,254

ANEXO V

Resultados expressos em índice de reatividade (IR) do ELISA Sanduíche para a pesquisa de antígeno em amostras de soro referentes aos diferentes tempos de coleta dos animais infectados experimentalmente. Cada animal foi representado pelo número de cistos encontrado no seu exame *post-mortem*.

IR obtidos por ELISA Sanduíche nos soros de suínos infectados experimentalmente							
Tempo (dias p.i.)	85 cistos	60 cistos	47 cistos	26 cistos	11 cistos	6 cistos	1cisto
t14	1,850	1,780	3,620	2,520	2,050	2,650	1,500
t21	1,990	1,800	2,530	2,670	2,170	2,600	1,330
t28	1,830	1,690	2,670	2,450	2,090	2,990	1,450
t42	1,970	1,720	2,730	2,800	2,150	2,050	1,510
t56	1,810	1,760	2,890	2,560	2,130	2,200	1,490
t70	2,000	1,880	2,550	2,600	2,330	2,150	1,290
t84	2,060	1,950	2,670	2,730	2,150	2,230	1,400
t98	1,850	1,960	2,280	2,680	2,130	2,360	1,430
t112	1,780	2,090	2,460	2,630	2,380	2,550	1,300
t126	1,810	1,880	4,220	2,940	2,320	4,460	1,500
t140	1,730	1,840	2,590	2,760	2,310	2,680	1,520

Dias p.i.: Dias após a infecção experimental com 200.000 ovos de *T. solium*

ANEXO VI

Resultados em absorbância do ELISA Direto para a pesquisa de antígeno em amostras de soro referentes aos diferentes tempos de coleta dos animais infectados experimentalmente. Cada animal foi representado pelo número de cistos encontrado no seu exame *post-mortem*.

Absorbâncias obtidas por ELISA Direto nos soros de suínos infectados experimentalmente							
Tempo (dias p.i.)	85 cistos	60 cistos	47 cistos	26 cistos	11 cistos	6 cistos	1cisto
t14	0,231	0,244	0,201	0,119	0,263	0,247	0,290
t21	0,257	0,191	0,191	0,126	0,271	0,216	0,270
t28	0,243	0,230	0,228	0,156	0,253	0,208	0,298
t42	0,433	0,294	0,183	0,187	0,390	0,221	0,232
t56	0,220	0,308	0,137	0,138	0,219	0,196	0,163
t70	0,230	0,172	0,142	0,125	0,167	0,218	0,190
t84	0,196	0,186	0,117	0,135	0,180	0,246	0,176
t98	0,157	0,131	0,125	0,107	0,136	0,198	0,169
t112	0,208	0,122	0,112	0,112	0,148	0,200	0,173
t126	0,168	0,157	0,104	0,100	0,134	0,188	0,209
t140	0,201	0,185	0,120	0,153	0,182	0,161	0,227

Dias p.i.: Dias após a infecção experimental com 200.000 ovos de *T. solium*

ANEXO VII

Resultados em absorbância do ELISA Indireto para a pesquisa de anticorpos nas amostras de soro referentes aos diferentes tempos de coleta dos animais infectados experimentalmente. Cada animal foi representado pelo número de cistos encontrado no seu exame *post-mortem*.

Absorbâncias obtidas por ELISA Indireto nos soros de suínos infectados experimentalmente							
Tempo (dias p.i.)	85 cistos	60 cistos	47 cistos	26 cistos	11 cistos	6 cistos	1cisto
t14	0,420	0,807	0,313	0,480	0,369	0,550	0,293
t21	0,596	0,665	0,372	0,530	0,475	0,420	0,320
t28	0,779	0,367	0,600	0,546	0,658	0,420	0,480
t42	1,103	0,522	0,670	0,750	0,348	0,590	0,300
t56	0,960	0,478	0,614	0,717	0,320	0,386	0,550
t70	0,941	0,650	0,586	0,875	0,438	0,708	0,800
t84	1,247	0,910	0,680	0,980	0,375	0,849	0,784
t98	1,224	0,918	0,450	0,670	0,528	0,818	0,754
t112	0,534	0,782	0,640	0,699	0,440	0,580	1,050
t126	0,850	0,535	0,680	0,790	0,426	0,600	1,096
t140	1,110	0,518	0,795	0,930	0,427	0,649	0,853

Dias p.i.: Dias após a infecção experimental com 200.000 ovos de *T. solium*

ANEXO VIII

Resultados obtidos utilizando IB 18/14 e IB LLGP em amostras de soro de suínos infectados experimentalmente referentes aos diferentes tempos de coleta. A reatividade foi representada por (R) e sua ausência por (nr). Os ensaios não realizados foram indicados por (...).

Suínos	Tempo	IB 18/14 (KDa)				IB LLGP (KDa)				
		18	14	50	39-42	24	21	18	14	13
85	to	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t14	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t21	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t28	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t42	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t56	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t70	R	R	R	R	R	nr	nr	nr	nr
	t84	R	R	R	R	R	nr	R	nr	R
	t98	R	R	R	R	R	nr	R	nr	R
	t112	R	R	R	R	R	nr	R	nr	R
60	t126	R	R	R	R	R	nr	R	nr	R
	t140	R	R	R	R	R	nr	R	nr	R
	to	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t14	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t21	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t28	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t42	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t56	nr	R	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t70	R	R	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t84	R	R	R	R	R	nr	nr	nr	nr
47	t98	R	R	R	R	R	nr	nr	nr	nr
	t112	R	R	R	R	R	nr	nr	nr	R
	t126	R	R	R	R	R	nr	nr	nr	R
	t140	nr	R	R	R	R	nr	nr	nr	R
	to	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t14	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t21	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t28	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t42	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t56	nr	R	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
s	t70	R	R	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t84	R	R	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t98	R	R	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t112	R	R	R	nr	nr	nr	nr	nr	R
	t126	R	R	R	nr	nr	nr	nr	nr	R
	t140	R	R	R	nr	R	nr	nr	R	R

continua

Suínos	Tempo	IB 18/14 (KDa)				IB LLGP (KDa)				
		18	14	50	39-42	24	21	18	14	13
26	to	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t14	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t21	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t28	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t42	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t56	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t70	nr	R	R	nr	nr	nr	nr	nr	R
	t84	R	R	R	nr	R	nr	nr	nr	R
	t98	R	R	R	nr	R	nr	nr	nr	R
	t112	R	R	R	nr	R	nr	nr	nr	R
11	t126	R	R	R	nr	R	R	nr	R	R
	t140	R	R	R	nr	R	R	nr	R	R
	to	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t14	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t21	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t28	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t42	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t56	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t70	nr	R	nr	nr	nr	nr	nr	R	nr
	t84	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
6	t98	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t112	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t126	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t140	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	to	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t14	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t21	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t28	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t42	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t56	R	R	R	nr	nr	nr	nr	nr	nr
c	t70	nr	nr	R	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t84	nr	nr	R	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t98	nr	nr	R	R	nr	nr	nr	nr	nr
	t112	nr	nr	R	R	R	nr	nr	nr	nr
	t126	nr	nr	R	R	R	nr	nr	nr	nr
	t140	nr	nr	R	R	R	nr	nr	nr	nr
	to	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t14	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t21	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t28	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...

continuação

Suínos	Tempo	IB 18/14 (KDa)				IB LLGP (KDa)				
		18	14	50	39-42	24	21	18	14	13
1 c i s t o	to	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t14	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t21	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t28	nr	nr	...	...	...	...	...	...	...
	t42	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	t56	R	R	nr	R	nr	nr	nr	nr	nr
	t70	R	R	nr	R	R	nr	nr	nr	nr
	t84	R	R	nr	R	R	R	nr	nr	nr
	t98	R	R	nr	R	R	R	nr	nr	nr
	t112	R	R	nr	R	R	R	nr	R	nr
	t126	R	R	nr	R	R	R	nr	R	nr
	t140	R	R	nr	R	R	R	nr	R	nr

conclusão

ANEXO IX

Manuscrito submetido à *Veterinary Parasitology* em dezembro de 2005.

Swine cysticercosis screening by immunoassays in animals with low parasite burden

GOMES, A.B.^a, SOARES, K.A.^b, BUENO, E.C.^c, ESPÍNDOLA, N.M.^a, IHA, A.H.^a, MAIA, A.A.M.^b, PERALTA, R.H.S.^d, VAZ, A.J.^a

^aDepartamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580, bloco 17, 05508-900 São Paulo, SP, Brasil

^bDepartamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Avenida Duque de Caxias Norte 225, 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil

^cNúcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Rua Uruguai, 458, bloco 17, 88302-202, Itajaí, SC, Brasil

^dDepartamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Hospital Universitário Antonio Pedro, Rua Marques do Paraná, 303, 24030-210, Centro, Niterói, RJ, Brasil

Abstract

Seven 2-month-old Landrace swine were infected with 200,000 eggs of *Taenia solium* and blood samples from each pig were collected periodically. At the end of the experiment (140 days) the animals did not show clinical aspects of cysticercosis and parasites in tongue inspection; therefore they could be mistaken as healthy animals by usual inspection exams. All of them were slaughtered and their whole muscles, brain and visceral organs were cut into thin slices searching for cysts. The number of cysts found in each animal varies from 1 to 85 (with mean value of 33.7 and standard deviation of 31.3). The blood samples of experimentally infected animals were submitted to ELISA tests for antibody (Ab) detection using vesicular fluid antigen from *Taenia crassiceps* cysticerci and also for antigen (Ag) detection using monoclonal antibodies, which presented respectively 71% and 57% positivity. By immunoblot (IB) 18/14 (*Taenia crassiceps* antigen) and IB LLGP (lentil lectin purified glycoproteins of *T. solium*), 5 (71%) and 6 (86%) experimentally infected animals were positive, respectively. All of them could be considered healthy by conventional screening tests used in slaughterhouses. The use of immunoassays for detecting specific antibodies showed they are more accurate, therefore more useful than usual clinical examination for screening cysticercosis in slightly infected pigs.

Key words: Swine cysticercosis; Larval antigens; Antibodies; ELISA; Immunoblot

1. Introduction

Cysticercosis is an infection frequent in pigs and humans of developing countries. The cyst is the larval stage in the tissue of pigs that ingested viable eggs of *Taenia solium*. When humans ingest raw or undercooked pork meat containing *T. solium* cysts, they develop adult tapeworm in their small intestine (Garcia and del Bruto, 2000; Verastegui et al., 2003). The contact of swine and people with human feces, the lack of pork meat inspection, the consumption of uncooked or undercooked pork meat are factors promoting and maintaining such disease transmission (Sarti et al., 1988; Garcia et al., 1991; Flisser et al., 1994).

The inspection of pork meat for human consumption, showing about 70% of sensitivity (Phiri et al., 2002; Ngowi et al., 2004), reduces the transmission risk mainly when animals are raised illegally and present high degree of infection. On the other hand, the inspection in low parasite burden animals could be less efficient since a detailed *post-mortem* exam of the meat would cause commercial losses (Gonzalez et al., 1990; Pinto et al., 2000).

Immunoassays for antibody detection can be useful on a stage previous then slaughter, identifying the non-infected animals from those probably infected. Several authors have been using ELISA and IB (Gonzalez et al., 1990; Pathak et al., 1994; Aluja et al., 1996; Sciutto et al., 1998) with sensitivity and specificity over 70% and 73%, respectively for ELISA, and 90% and 100%, respectively for IB, showing the advantages of the IB assay. Some authors have used the *T. crassiceps* antigen in replacement of *T. solium* larvae antigen, especially when it is hard to obtain cysts of naturally infected pigs (Biondi et al., 1996; Pinto et al., 2000; Nunes et al., 2000).

Many studies report good efficiency on Ag research and cysts in cerebral spinal fluid (CSF) of patients with neurocysticercosis (Chang-Yuan et al., 1992; Diaz et al., 1992; Garcia et al., 2000; Pardini et al., 2001) but the use of serum samples introduces several circulating components that can interfere in the assay, turning it a less reproducible method. There are reports of lower efficiency on Ag research in swine serum even in animals with high infection levels. Part of these studies presented confirmed clinical and *post-mortem* examination infection (Sciutto et al., 1998; Nguekam et al. 2003; Rodríguez-Hidalgo et al., 2003; Sato et al., 2003).

Our aim is to implement more accurate and efficient methods through the immunoassay evaluation for antibodies and antigens detection in order to improve the screening of swine with low levels of parasite burden.

2. Materials and methods

2.1. Experimental infection

T. solium was obtained from a patient after niclosamide treatment. The eggs were obtained from gravid proglottids, carefully washed and stored in physiological saline at 4°C during 28 days. Seven 2-month-old Landrace pigs were orally infected with 200,000 eggs and the animals were bred in intensive pig farming. The food and water were controlled during the experiment to avoid possible contaminations. Blood samples of each of the animals were collected periodically during a period of 140 days. Serum samples were

separated and stored at -20°C . At the end of the experiment, all pigs were humanly slaughtered and their whole muscles, brain and visceral organs (heart, lungs, liver, kidneys and spleen) were cut into thin slices (about 0.5 cm) in search of cysts. After that they were counted and classified as vesicular or caseous, depending on their macroscopic appearance. For better presenting the results the letter 't' was used before a number, when 't' means the collecting time after the experimental infection and the number stands for the day of blood collection.

2.2. Control Groups

The negative control group was composed of 15 serum samples of pigs, which were raised on a local farm with very good hygienic conditions and without any case of cysticercosis or other parasitic diseases.

The positive control group was composed of 4 serum samples of pigs with cysticercosis, confirmed by necropsy, and 10 serum samples of pigs from endemic area showing positive results for antibodies by ELISA and IB (Espíndola et al., 2005).

2.3. Antigens

The vesicular fluid of *Taenia crassiceps* (VF-Tcra) was obtained as described by Vaz et al. (1997). The 18/14 kDa protein was obtained from VF-Tcra as described by Espíndola et al. (2005). The strips for immunoblot with lentil lectin purified glycoproteins of *T. solium* (LLGP) and the reagents for immunoblot were kindly provided by Dr. Victor C. W. Tsang, of the Immunology Department, Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, USA.

2.4. SDS-PAGE and Immunoblot (IB)

The separated antigen was electrophoretically transferred to a 0.22 μm -pore-size membrane (Millipore Corp.) for IB 18/14 analysis and then stored at -20°C . The membranes were blocked by treatment with 5% skim milk in PBS containing 0.3 % Tween 20 (Merck, Germany) for 2 h and washed in PBS containing 0.3 % Tween 20 (PBS-T).

Both membranes, 18/14 and LLGP, were performed similarly as described by Tsang et al. (1989) with some modifications. The conjugated and dilution sample solution was 1% skim milk in PBS-T and the specific anti-pig IgG peroxidase conjugate was diluted 1:8,000. The presence of any band was considered a positive reaction for 18/14 (18- and/or 14 kDa) and for LLGP (50-, 42-39-, 24-, 21-, 18-, 14-, 13 kDa).

2.5. Detection of antibody by ELISA (Ab-ELISA)

Flat-bottom polystyrene plates (Costar Corning, USA) were coated with 100 μL of VF-Tcra (0,05 $\mu\text{g}/\text{well}$) in 0.5 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9,6) for 18 h at 4°C . Skim milk (5%) in PBS solution containing 0.05 % Tween 20 was used as a blockade. The solution of sample and conjugate dilution was 1% skim milk in PBS containing 0.05% Tween 20. Serum samples (diluted 1:50), conjugated (peroxidase-

labeled rabbit anti-pig IgG [Sigma, USA] with dilution of 1:6,000), and OPD/H₂O₂ chromogen substrate (ortho-phenylenediamine [1g/liter] and H₂O₂ [1mL/liter] in 0.2 M citrate buffer [pH 5.0]) in volumes of 100 µL/well were used. Incubations were carried out at 37°C for 1 h in all steps except for that with the substrate (15 min). The reaction was interrupted with 4 N H₂SO₄. The absorbance was obtained at 492 nm in a plate reader (SLT-Spectra, USA). The *cut off* was chosen using the ROC Curve as described by Kollef and Shuster (1994).

2.6. Detection of circulating antigen by sandwich – ELISA (Ag-ELISA)

Serum samples were tested for detecting circulating antigens of *T. solium* using Ag-ELISA with anti-excretory/secretory antigens of *in vitro* cultures of *T. crassiceps* cysticerci monoclonal antibodies (MoAb anti-ES) obtained by Espindola et al. (2002) with dilution of 1:5,000 in PBS 0.02 M. The coated plates were incubated at 37°C for 2 hours and at 4°C for 18 hours. A solution of 3% oxidized bovine serum albumin (Glass et al., 1981) in PBS solution containing 0.05% Tween 20 was used as blockade. The dilution solution of sample and conjugates was 1% oxidized bovine serum albumin in PBS solution containing 0.05% Tween 20. All incubations were carried out at 37°C, except for the serum samples. The plates were washed with 0.15 M NaCl containing 0.05% Tween 20. Serum samples, 1:100 diluted, were added and incubated at 37°C for 1 h and at 4°C for 18 hours. After washing it, biotinylated MoAb anti-ES (Bayer et al., 1976; Guesdon et al., 1979; Bayer and Wilchek, 1980) was conducted. After incubation and washing procedures the second conjugate avidin-peroxidase (Sigma Chem. Co., USA) was added. The chromogen substrate was OPD/ H₂O₂ 100 µL/well and after 15 min the reaction was interrupted with 4 N H₂SO₄. The absorbance was obtained at 492 nm in a plate reader (SLT-Spectra, USA). All incubations were carried out at 37°C. The results were expressed in reactivity index (RI), which was the ratio between the absorbance of the tested samples and the blanks of the reactions. The blank was composed of all components of the assay, except the sample itself. The optimum dilution for the conjugates was obtained by titration using positive and negative control samples. The *cut off* was chosen using the ROC Curve as described by Kollef and Shuster (1994).

2.7. Ethics Committee Approval

Animal manipulations were approved by the Ethics Committee for Experimental Animals of the FCF/USP (project 13/2003) adopted by the Brazilian Committee for Experimental Animals.

3. Results

3.1. Parasite Burden

The animals were humanly slaughtered 140 days after the experimental infection. No animals presented clinical aspects of cysticercosis. When conducting detailed *post-mortem* exam (not routinely used) it was found that the number of metacestodes in muscles varied greatly from one pig to another (1 to 85 with mean value of 33.7 and standard deviation of 31.3). All cysts found showed vesicular aspects.

The presence of cysts in the heart of five animals, out of which three presented palpation undetectable cysts on their tongues, was observed (Table 1). The efficiency of the experimental infection obtained was low presenting a mean value of 0.17‰ (0.01‰ to 0.42‰).

3.2. Detection of antibody by ELISA (Ab-ELISA) and IB

The Ab-ELISA test with VF-Tcra showed sensitivity of 93% and specificity of 100% for the control groups. The detection of antibodies through the ELISA test was positive at the end of the experiment (t140) for five animals (71%). The animals with 60 and 11 cysts were not detected on the slaughter day (Fig 1).

The IB 18/14 was positive for 3 animals (43%), showing 1, 47 and 60 cysts starting in t56 and for more 2 animals (71% corresponding to these five animals) showing 26 and 85 cysts, starting in t70. In addition, the animal with 6 cysts was positive just in t56 (by IB LLGP the positivity was kept until the end). The pig with 11 cysts showed reactivity in both IB tests just in t70 (varying between positive and negative in Ab-ELISA) (Table 2 and Fig. 1).

The IB LLGP reactivity started in t56 for 2 animals (29%), one with 1 and the other with 6 cysts; while it started in t70 for other 2 animals (57% corresponding to these four animals), with 26 and 85 cysts respectively. For two other animals (reaching 86% all together) it became positive 84 and 112 days after the infection. The early recognized bands were 50 kDa and 24 kDa (29%). The reactivity standard was really heterogeneous (Table 2).

Therefore, the positivity rates were 71% and 86 % at the end of the experiment (t140) for IB 18/14 and IB LLGP, respectively.

3.3. Detection of circulating antigen by sandwich-ELISA (Ag-ELISA)

The Ag-ELISA showed sensitivity of 85.7% and specificity of 100% (control groups). For the serum samples of experimental infection the assay was positive in 4 animals (57%) in t140 and the same animals showed reactivity starting in t112. The pig with 11 cysts (showing negative reactivity by IB and Ab-ELISA at the end of the infection) and the one with 6 cysts presented reactivity in all the assayed samples (Fig. 2).

4. Discussion and conclusions

Several authors have agreed that pigs with low cyst burden may escape from being detected by meat inspection, therefore maintaining parasite transmission when slightly infected carcasses remain in the food chain (Nunes et al., 2000; Sciutto et al., 1998). In our experiment, none of the animals slaughtered after 140 days of the infection showed clinical aspects of cysticercosis or cysts by tongue palpation or by conventional *post-mortem* exam, a visual examination on different sites of the carcass including heart, diaphragm, masseters, tongue, neck, shoulder, intercostal and abdominal muscles (Boa et al., 2002). Other authors have agreed that necropsy is not appropriate to identify apparently healthy

pigs since lesions could be overlooked in animals with low infection (Gonzalez et al., 1990). Besides, the best routinely used exam requires meat-screening cuts what is not desirable for commercial purposes.

The infection efficiency obtained was low with mean value of 0.17‰ (from 0.01‰ to 0.42‰). Other authors have obtained better results, from 0.28% to 5% (Molinari et al., 1983; Pathak and Gaur, 1990; Tsang et al., 1991; Nascimento et al., 1995) and the ingestion of entire proglottids is the most efficient way of infection (Nguekam et al., 2003). We have to consider that all animals were exposed to an equal number of eggs and possibly some parasites were destroyed by the immune response of some animals during parasite development stages. The efficiency for establishing the infection may also depend on the viability of the eggs (Santamaria et al., 2002) and we cannot ignore the possibility that only few eggs remained viable.

The absolute development of cysts can take about 60 days after ingesting the eggs (Flisser, 1991; Carpio, 2002). In our study only vesicular cysts were observed at t140. In agreement with our results, Aluja et al. (1996) found caseous cysts only 200 days after the infection. On the other hand, Santamaria et al. (2002) found the presence of caseous cysts as early as 60 days after the experimental infection.

In the standardization of the immunoassays we used serum samples from animals that had lived under good raising conditions and without contacting garbage or feces, reproducing animal condition of experimental infection. Thus, the reactivity observed for the infected group was expected to be only a result of the ingestion of *T. solium* eggs. The performance of immunoassays for detecting antigens and/or antibodies in slightly infections is not quite clear. The experimentally infected animals included in this research compose a group of slightly infected animals, and as the commercialized animals are supervised and there is a control of origin, it is expected that if infections ever occur it would be a light one.

Although the Ab-ELISA showed 93% of positivity in the control group (highly infected animals) only five experimentally infected animals (71%) showed positive results of antibodies at the end of the experiment (t140). Sato, et al. (2003) obtained better sensitivity, as early as 30 days after the experimental infection in pigs with 16 or more cysts. The use of glycoproteins and recombinant antigens could justify such better efficiency. If Ab-ELISA was used for screening, a 0.4 cut off could be adopted and it would allow the detection of all animals. On the other hand, the specificity of the test would be only 62% turning the assay less interesting for screening animals since it must lead to the use of IB assay for confirming the infection, increasing costs and screening time (Fig. 1).

By both IB (18/14 and LLGP) the reactivity standard was found really heterogeneous (Table 2). The positivity rates were 71% and 86% at the end of the experiment (t140) for IB 18/14 and IB LLGP, respectively. In the IB LLGP the early-recognized bands were 50- and 24 kDa. On the other hand, Aluja et al. (1996) described that the antigens of 13-, 14- and 18 kDa were most frequently recognized in early infections and the antigens of 42-, 50- and 24 kDa were recognized during later stages of the infection.

The difference of sensitivity observed in Ag-ELISA for the positive control group (85.7%) and the experimental infected animals (57%) probably resulted of the low infection rate of the second group.

However, we must remember that the assay did show high specificity (100%), in accordance with other authors (Sciutto et al., 1998; Nguekam et al., 2003).

The results here obtained allowed to identify 6 infected animals (86%) by antibodies detection (IB LLGP) and the seventh was detected by Ag-ELISA. By IB 18/14 five (71%) animals could be detected and the other two were detected by Ag-ELISA. It is possible that immunocomplexes were formed with the antigen-antibody equivalence, or more probably by the excess of antigens, once these animals (with 6 and 11 cysts) showed reactivity in all the samples assayed in the Ag-ELISA (Fig. 2). Nguekam et al. (2003) suppose that the strong variation in circulating antigen level might be a result of cysticerci varying metabolic activity and/or of differences in the permeability of the connective tissue capsule around the cysts, only in pigs with less than 100 cysts. These data are in accordance with our results and they also suggest further investigations on antigen detection providing better results and helping to screen animals in slaughterhouses.

The antigen detection together with the researching of antibodies seems to be adequate especially for groups with negative results in IB. The application of these assays in a larger number of animals under adequate raising conditions and the detailed analyzes of each positive case could help to better define an algorithm to immunoassays applied in swine cysticercosis screening. It is important to point out that the use of immunoassays for detecting antibodies and/or antigens showed to be more useful than clinical and/or *post-mortem* examination for cysticercosis screening in slightly infected pigs.

Acknowledgements

We thank Dr Victor C. W. Tsang of the Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, (DPD-CDC) USA for the generous donation of the strips and reagents for IB LLGP, and Dr Kathy Hancock (DPD-CDC) for comments on and review of the manuscript.

We thank Dr Paulo Sérgio de Arruda Pinto of Universidade Federal de Viçosa, Brasil and Msc Marcelo of Universidade Federal do Piauí, Brasil for the donation of some serum samples of pigs with cysticercosis.

This research was supported by FAPESP (grant 2002/12061-0 to A. J. V.), by a FAPESP fellowship to N.M.E. (03/10747-4), and by a CNPq fellowship to A.H.I. (107974/2003-7).

References

- Aluja, A.S., Villalobos, A.N.M., Plancarte, A., Rodarte, L.E., Hernández, M., Sciuto, E., 1996. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: Characteristics of the infection and antibody response. *Vet. Parasitol.* 61, 49-59.
- Bayer, E.A., Wilchek, M., Skutelsky, E., 1976. Affinity cytochemistry: The localization of lectin and antibody receptors on erythrocytes via the avidin-biotin complex. *FEBS Lett.* 68, 240-244.

- Bayer, E.A., Wilchek, M., 1980. The use of avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem. Anal.* 26, 1-45.
- Biondi, G.F., Mucciolo, R.G., Nunes, C.M., Richtzenhain, L.J., 1996. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestodes. *Vet. Parasitol.* 64, 261-266.
- Boa, M.E., Kassuku, A.A., Willingham III, A.L., Keyyu, J.D., Phiri, I.K., Nansen, P., 2002. Distribution and density of cysticerci of *Taenia solium* by muscle groups and organs in naturally infected local finished pigs in Tanzania. *Vet Parasitol.* 106, 155-164.
- Carpio, A., 2002. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2 (12), 751-762.
- Chang-Yuan, W., Hong-Hua, Z, Ling-Yun, G., 1992. A MoAb-Based ELISA for detection circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. *Hybridoma.* 11, 825-827.
- Diaz, J.F., Verastegui, M., Gilman, R.H., Tsang, V.C.W., Pilcher, J.B., Gallo, C., Garcia, H.H., Torres, P., Montenegro, T., Miranda, E., The cysticercosis working Group of Peru, 1992. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison an antibody-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 610-615.
- Espíndola, N.M., Vaz, A.J., Pardini, A. X., Fernandes, I., 2002. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96(4), 361-368.
- Espíndola, N.M., Iha, A. I., Fernandes, I., Takayanagui, O. M., Machado, L.R., Livramento, J.A., Maia, A.A.M., Peralta, J.M., Vaz, A.J., 2005. Cysticercosis Immunodiagnosis Using 18- and 14- Kilodalton Proteins from *T. crassiceps* Cysticercus Antigens Obtained by Immunoaffinity Chromatography. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3178-3184.
- Flisser, A., 1991. Taeniasis-Cysticercosis: an introduction. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 22, 233-235.
- Flisser, A., Madrazo, I., Plancarte, A., Schantz, P., Allan, J., Craig, P., Sarti, E., 1994. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after a single taenicidal dose of praziquantel. *Lancet.* 342, 748.
- Garcia, H.H. and del Bruto, O.H., 2000. *Taenia solium* cysticercosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 14, 97-119.
- Garcia, H.H., Martinez, M., Gilman, R., Herrera, G., Tsang, V.C., Pilcher, J.B., Diaz, F., Verastegui, M., Gallo, C., Porras, M., 1991. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. *Lancet.* 338, 549-551.
- Garcia, H.H., Parkhouse, R.M.E., Gilman, R.H., Montenegro, T., Bernal, T., Martinez, S.M., Gonzales, A.E., Tsang, V.C., Harrison, L.J.S., The cysticercosis Working group in Peru., 2000. Serum antigen

- detection in the diagnosis, treatment and follow-up of neurocysticercosis patients. Trans . R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94, 673-676.
- Glass, W.F., Bridggs, R.C., Hnilica, L.S., 1981. Use of lectins for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. Anal. Biochem. 115, 219-224.
- Gonzalez, A.E., Cama, V., Gilman, R.H., Tsang, V.C., Pilcher, J.B., Chavera, A., Castro, M., Montenegro, T., Verastegui, M., Miranda, E., 1990. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue inspection for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43 (2), 194-199.
- Guesdon, J.L., Arameas, S., 1979. Polyacrilamide-agarose beads for the preparation of effective immunoabsorbents. J. Immunol. Methods. 11, 129-133.
- Kollef, M.H., Schuster, D.P., 1994. Predicting intensive care unit outcome with scoring systems. Underlying concepts and principles. Crit. Care Clin. 10 (1), 1-18
- Molinari, J.L., Meza, R., Suárez, B., Palacios, S., Tato, P., 1983. *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercus. Exp. Parasitol. 55, 340-357.
- Nascimento, E.J., Costa, O., Guimares, M.P., Tavares, C.A.P., 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 45, 127-137.
- Ngowi, H.A., Kassuku, A.A., Maeda, G.E., Boa, M.E., Willingham, A.L., 2004. A slaughter slab survey for extra-intestinal porcine helminth infection in northern Tanzania. Trop. Anim. Health Prod. 36 (4), 335-340.
- Nguekam, A., Zoli, A.P., Vondou, L., Pouedet, S.M.R., Assana, E., Dorny, P., Brandt, J., Losson, B., Geerts, S., 2003. Kinetics of circulating antigens in pigs experimentally infected with *Taenia solium* eggs. Vet. Parasitol. 111, 323-332.
- Nunes, C.M., Biondi, G.F., Heinemann, M.B., Richtzenhain, L.J., 2000. Comparative evaluation of an indirect ELISA test for diagnosis of swine cysticercosis employing antigen from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes. Vet. Parasitol. 93, 135-140.
- Pardini, A.X., Vaz, A.J., Machado, L.R., Livramento, J.A., 2001. Cysticercus Antigens in Cerebrospinal Fluid Samples from Patients with Neurocysticercosis. J. Clin. Microbiol. 39 (9), 3368-3372.
- Pathak, K.M.L., Gaur, S.N.S., 1990. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. Vet Parasitol. 34, 353-356.
- Pathak, K.M., Allan, J.C., Ersfeld, K., Craig, P.S., 1994. A western blot and ELISA assay for the diagnosis of *Taenia solium* infection in pigs. Vet. Parasitol. 53 (3-4): 209-217.
- Phiri, I.K., Dorny, P., Gabriel, S., Willingham III, A.L., Speybroeck, N., Vercruysse, J., 2002. The prevalence of porcine cysticercosis in Eastern and Southern provinces of Zambia. Vet. Parasitol. 108, 31-39.

- Pinto, P.S.A., Vaz, A.J., Germano, P.M.L., Nakamura, P.M., 2000. Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *Vet. Parasitol.* 88, 127-180.
- Rodriguez-Hidalgo, R., Benítez-Ortiz, W., Dorny, P., Geerts, S., Geysen, D., Ron-Román, J., Proaño-Pérez, F., Chávez-Larrea, M.A., Barrionuervo-Samaniego, M., Celi-Fraza, M., Vizcaíno-Ordoñez, L., Brandt, J., 2003. Taeniosis-cysticercosis in man and animals in the Sierra of Northern Ecuador. *Vet. Parasitol.* 118, 51-60.
- Santamaría, E., Plancarte, A., Aluja, A., 2002. The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: Immune response and efficiency of establishment. *J. Parasitol.* 88, 69-71.
- Sarti, E., Schantz, P., Lara, R., Gómez, H., Flisser, A., 1988. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 194-198.
- Sato, M.O., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., Plancarte, A., Kassuku, A.A., Dorny, P., Geerts, S., Benitez-Ortiz, W., Hashiguchi, Y., Ito, A., 2003. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. *Vet. Parasitol.*, 309-322.
- Sciutto, E., Martinez, J.J., Villalobos, N.M., Hernandez, M., Hose, M.V., Beltran, C., Rodarte, F., Flores, I., Bobadilla, J.R., Fragosó, G., Parkhouse, M.E., Harrison, L.J., de Aluja, A.S., 1998. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet. Parasitol.* 79, 299-313.
- Tsang, V. C. W., Brand, J. A., Boyer, A. E., 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* 159 (1), 50-59.
- Tsang, V.C., Pilcher, A.J., Zhou, W., Boyer, E.A., Kamangoman, I.P.E., 1991. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 29, 69-78.
- Vaz, A.J., Nunes, C.M., Piazza, R.M.F., Livramento, J.A., Silva, M.V., Nakamura, P.M., Ferreira, A.W., 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57 (3), 354-357.
- Verastegui, M., Gilman, R.H., Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Arana, Y., Jeri, C., Tuero, I., Gavidia, C.M., Levine, M., Tsang, V.C.W. and The Cisticercosis Working Group in Peru, 2003. Prevalence of antibodies to unique *Taenia solium* onchosphere antigens in taeniasis and human and porcine cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69 (4), 438-444.

Table 1. Distribution of cysts per organs and areas of experimentally infected pigs. Each column corresponds to one animal.

Organ/Area	Number of cysts in experimentally infected pigs						
Heart	4	9	4	2	0	1	0
Diaphragm	0	4	3	2	0	0	0
Tongue	3	5	0	1	0	0	0
Masseter	7	0	4	1	2	0	0
Cervical Area	2	0	0	0	0	0	0
Esophagus Area	0	0	1	0	0	0	0
Anterior Limb	28	13	7	4	3	3	0
Posterior Limb	32	7	15	8	4	1	1
Dorsal Area	9	18	12	6	2	0	0
Neck Area	0	2	1	2	0	1	0
Maxillary Area	0	2	0	0	0	0	0
Total per animal	85	60	47	26	11	6	1

Table 2. Results of IB 18/14 and IB LLGP of serum samples of experimentally infected animals in all different collecting days. The number of cysts found in *post-mortem* examination represents each animal and the results were expressed when the first reactivity was observed. The reactivity presented only once was indicated by asterisk (*).

Animal # of Cysts	IB 18/14		IB-LLGP (kDa)						
	18	14	50	39-42	24	21	18	14	13
85	t70	t70	t70	t70	t70	-	t84	-	t84
60	t70	t56	t84	t84	t84	-	-	-	t112
47	t70	t56	t112	-	t140	-	-	t140	t112
26	t84	t70	t70	-	t84	t126	-	t126	t70
11	-	t70*	-	-	-	-	-	t70*	-
6	t56*	t56*	t56	t98	t112	-	-	-	-
1	t56	t56	-	t56	t70	t84	-	t112	-

Fig. 1. Results expressed in absorbance levels for the serum samples of seven experimentally infected pigs at each collecting time, and for positive and negative control groups by Ab-ELISA. The experimentally infected animals were represented in accordance with the number of cysts found in the *post-mortem* examination.

Fig. 2. Results expressed in reactivity index for the serum samples of seven experimentally infected pigs on each collecting time, and for positive and negative control groups by Ag-ELISA. The experimentally infected animals were represented in accordance with the number of cysts found in the *post-mortem* examination.

ANEXO X

Aval do Comitê de Ética em Pesquisa.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of. CEEA nº 12

CERTIFICADO

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.

*Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*

ANEXO XI**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP