**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Curso de Pós-graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

**UTILIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES ANTIGÊNICAS DE
CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* PARA PESQUISA DE
ANTICORPOS NA NEUROCISTICERCOSE (*Taenia solium*)**

ALESSANDRA XAVIER PARDINI

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientadora:
Prof^a Dr^a Adelaide José Vaz**

**São Paulo
2000**

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

P226u Pardini, Alessandra Xavier
Utilização de preparações antigênicas de cisticercos de *Taenia crassiceps* para pesquisa de anticorpos na neurocisticercose (*Taenia solium*) / Alessandra Xavier Pardini. -- São Paulo, 2000. 104p.

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

Orientador : Vaz, Adelaide José

1. Imunologia 2. Parasitologia médica I. T. II. Vaz, Adelaide José, orientador.

615.37 CDD

ALESSANDRA XAVIER PARDINI

**UTILIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES ANTIGÊNICAS DE
CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* PARA PESQUISA DE
ANTICORPOS NA NEUROCISTICERCOSE (*Taenia solium*)**

Dissertação para Obtenção do Grau de MESTRE

Comissão Julgadora

Prof^a Dr^a Adelaide José Vaz
Orientador/Presidente

Prof^a Dr^a Kioko Takei

Prof. Dr. José Antônio Livramento

A Deus pela proteção e auxílio.
A Nossa Senhora Aparecida pela proteção e auxílio.

A meus pais Euclides e Isis,
pelo apoio e incentivo.

A meus irmãos Junior, Carla e Aurélio,
pelo carinho.

A Adelaide, mais que uma orientadora, uma amiga, exemplo de trabalho e seriedade, meu eterno agradecimento e admiração, muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Adelaide José Vaz, pela orientação, dedicação, carinho, apoio e exemplo de trabalho;

Ao Prof. Dr. José Mauro Peralta e a doutoranda Regina Helena Peralta da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela oportunidade de trabalho em conjunto;

A Banca do Exame Geral de Qualificação, Prof. Associado Dr. José Antônio Livramento, Dr^a. Mirthes Ueda, Prof^a. Dr^a. Yoshimi I. Yamamoto, Dr. Luis dos Ramos Machado, Prof^a. Dr^a. Marisa Porta M. Hirschfeld; pelas sugestões pertinentes;

Ao laboratório de Líquor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas amostras de LCR gentilmente cedidas;
Ao Dr. Jorge Fagundes da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pelas amostras de LCR de pacientes com neurosífilis. Ao Laboratório Spina França pelas amostras de LCR de pacientes com esquistossomose;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Clínica pelo convívio e apoio;

Ao pesquisador Paulo Mutuko Nakamura pelo carinho e suporte técnico;

A FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro;

A Biolab-Meuriex, pelo conjugado utilizado.

ÍNDICE

RESUMO	
SUMMARY	
ABREVIACÕES	
INTRODUÇÃO	01
PROPOSIÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
Obtenção dos Parasitas	23
Extratos Antigênicos	24
Caracterização dos Extratos Antigênicos	26
Amostras	31
Testes imunológicos	33
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	92

RESUMO

O complexo teníase-cisticercose humana representa importante problema sócio-econômico e de Saúde Pública em países em desenvolvimento, incluindo nosso país. A forma mais grave da doença decorre da localização de cisticercos no Sistema Nervoso Central, a neurocisticercose.

Devido à dificuldade de obtenção de parasitas a partir de suínos naturalmente infectados estudamos como fonte alternativa, preparações antigênicas de cisticercos de *Taenia crassiceps* (antígeno heterólogo), para pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em líquido cefalorraquiano (LCR) de pacientes com neurocisticercose.

Foram estudados os extratos antigênicos de líquido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* (LV-Tcra) e as frações purificadas por Concanavalina A (ConA-Tcra) obtida por coluna de afinidade com lectina e glicoprotéico fracionado (GP-Tcra) obtida a partir do antígeno LV-Tcra em eletroforese preparativa.

Os antígenos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. solium*, foram ensaiados por ELISA em amostras de LCR e por imunoblot em amostras de LCR e soro. Foi utilizado também, kit comercial ELISA com antígeno de *T. solium*.

A sensibilidade e a especificidade obtidas para os antígenos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra no teste ELISA foram de 100%, com boa reprodutibilidade.

Os peptídeos em ordem de frequência de reatividade para o antígeno LV-Tcra foram: 14-11kD (100%), 62kD (100%), 68kD (100%), 91kD (76%), 25kD (70%), 46kD (64%), 18kD (58%), 43kD (23%), 9-8kD (17%), 56kD (11%) e 32kD (11%). Para o antígeno ConA-Tcra foram identificados os peptídeos, por ordem de frequência, 14kD (100%), 28kD (66%), 18kD (55%), 46kD (44%), 43kD (22%), 94kD (22%), 103kD (22%). Para o antígeno GP-Tcra, foram identificados somente os peptídeos de 14 – 18kD. Amostras de LCR de pacientes com esquistossomose não apresentaram reatividade com os

Resumo

extratos antigênicos e uma amostra de LCR de paciente com neurosífilis, apresentou forte reatividade com os peptídeos de baixo peso molecular $\leq 20\text{kD}$, para os três antígenos, inclusive no teste ELISA comercial com antígeno de *T. solium*.

Os resultados confirmam que os antígenos de *T. crassiceps* são importantes fontes alternativas de extratos antigênicos. As frações glicoprotéicas mostraram-se eficientes na detecção de anticorpos anti-*T. solium* em amostras de LCR e soro de pacientes com neurocisticercose.

SUMMARY

The use of antigenic preparation of *Taenia crassiceps* cysticercus detect antibodies in neurocysticercosis (*Taenia solium*)

The human taeniasis-cysticercosis complex represents an important socioeconomic and Public Health problem in developing countries, including Brazil. The most severe form of the disease is due to the localization of cysticerci in the Central Nervous System, i.e. neurocysticercosis.

Due to the difficulty in obtaining parasites from naturally infected swine, we studied an alternative source consisting of *Taenia crassiceps* cysticerci (heterologous antigen) for the search of anti-cysticercus antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) from patients with neurocysticercosis.

We studied the antigenic extracts of vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci (VF-Tcra) and the purified fractions Concanavalin A (ConA-Tcra) obtained from an affinity column with lectin and fractionated glycoprotein (GP-Tcra) obtained from the VF-Tcra antigen by preparative electrophoresis.

The VF-Tcra, ConA-Tcra and GP-Tcra antigens for the detection of IgG antibodies were assayed by ELISA in CSF samples and by immunoblot in CSF and serum samples. A commercial ELISA kit with *T. solium* antigen was also used.

The sensitivity and specificity obtained for the VF-Tcra, ConA-Tcra and GP-Tcra were 100% in the ELISA test, with good reproducibility.

The peptides in order of frequency of reactivity with the VF-Tcra antigen were: 14-11kD (100%), 62kD (100%), 68kD (100%), 91kD (76%), 25kD (70%), 46kD (64%), 18kD (58%), 43kD (23%), 9-8kD (17%), 56kD (11%), and 32kD (11%). The following peptides, in order of frequency were identified for the ConA-Tcra antigen: 14kD (100%), 28kD (66%), 18kD (55%), 46kD (44%), 43kD (22%), 94kD (22%), and 103kD (22%). Only peptides of 14-18 kD were identified for the GP-Tcra antigen. CSF samples from patients with schistosomiasis did not show reactivity with the antigenic extracts and a CSF

Summary

sample from a patient with neurosyphilis presented strong reactivity with low molecular weight ($\leq 20\text{kD}$) peptides for the three antigens also in the commercial ELISA with the *T. solium* antigen.

The results confirm that *T. crassiceps* antigens are important alternative sources of antigenic extracts. The glycoprotein fractions proved to be efficient in detecting anti-*T. solium* antibodies in CSF and serum samples from patients with neurocysticercosis.

ABREVIACÕES

CN: controle negativo

ConA-Tcra: antígeno Concanavalina A de *Taenia crassiceps*

CP: controle positivo

GP-Tcra: antígeno glicoprotéico de *Taenia crassiceps*

LCR: líquido cefalorraquiano

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

NC: neurocisticercose

PBS: solução salina tamponada com fosfatos

PM: peso molecular

RMN: ressonância magnética nuclear

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SNC: Sistema Nervoso Central

T. crassiceps: *Taenia crassiceps*

T. ovis: *Taenia ovis*

T. saginata: *Taenia saginata*

T. solium: *Taenia solium*

TC: tomografia axial computadorizada

INTRODUÇÃO

HISTÓRICO

A cisticercose, também, denominada ladraria (galicismo, derivado do francês-*ladrerie*), é doença conhecida desde a mais alta antigüidade. Aristófonos já assinalava que cozinheiros examinavam a língua dos leitões a fim de verificar se debaixo delas não existiam “pedras”. Desde então, a doença foi reconhecida nos animais (tanto no gado bovino como no porcino) e no homem. Nos meados do século XVI (em 1558), Rumler descreveu a existência de cisticercos no cérebro de um paciente que sofrera, em vida, de epilepsia (PESSÔA, 1988).

NIETO, 1982, apresenta algumas notas históricas enfatizando a importância da cisticercose humana e animal. Aristóteles (384 – 322 aC) teria sido autor da primeira descrição da cisticercose suína e Paranoli descreveria o primeiro caso de neurocisticercose (NC) humana. O nome *Cysticercus* foi dado por Linnaeus (1756) e Rudolphi (1809), pela afinidade do parasita por tecido conjuntivo, acrescentou a palavra *cellulosae*. Em 1758, Linnaeus, denomina o verme adulto como *Taenia solium* e um século depois, Kückenmeister, 1855 e Leuckart, 1856, teriam demonstrado o ciclo biológico do parasita, por meio de experimentos em humanos e suínos.

A cisticercose é causada pela forma larvária da *Taenia solium*, *Cysticercus cellulosae*, instalada em tecidos e órgãos de suínos (hospedeiro

intermediário) e acidentalmente de humanos. O homem é o único hospedeiro definitivo da *T. solium*, sendo o responsável pela manutenção desta zoonose e podendo infectar-se acidentalmente ao ingerir carne suína crua ou mal cozida contendo cisticercos viáveis (teníase), ou ainda, pela ingestão de ovos em água e alimentos contaminados (cisticercose), por maus hábitos de higiene ou em consequência de movimentos antiperistálticos ou vômito, quando portador do verme adulto (VAZ & LIVRAMENTO, 1996).

BIOLOGIA

O parasita pertence ao filo *Platelmintes* (verme chato), classe *Cestoidea* (hermafrodita, desprovido de tubo digestivo, corpo achatado dorsoventralmente em forma de fita composta de segmentos gerados a partir do escólex), ordem *Cyclophyllidea* (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* (estróbilo constituído por grande número de proglotes e forma larvária com um escólex e vesícula caudal contendo líquido), espécie *solium* (rosto armado com dupla coroa de 24 a 32 acúleos) (apud VAZ, 1996).

CICLO EVOLUTIVO DO PARASITA

O parasita vive no intestino delgado humano e produz grande número de ovos que são armazenados nos úteros. Os ovos alcançam as fezes e o meio exterior quando os proglotes gravídicos se desprendem do estróbilo. Os proglotes podem ser eliminados intactos ou após liberarem os ovos que se dispersam no bolo fecal. Quando o hospedeiro intermediário apropriado, como o suíno na *T. solium*, ingere os ovos, as larvas (cisticercos) se desenvolvem nos tecidos. Após ingestão de carne suína com larvas viáveis, o cisticerco se desenvolve até verme adulto no intestino delgado do homem,

o hospedeiro definitivo (usualmente apenas um parasita em cada infecção) (HENRY, 1995).

Na fase adulta o verme mede em média de 2 a 3 metros, podendo alcançar 9 metros. É constituído de um escólex pequeno, 1mm de diâmetro, ligeiramente quadrangular e globoso, com quatro ventosas salientes, que auxiliam na fixação à mucosa intestinal. O rostro é pouco desenvolvido e armado com duas séries de acúleos. Em seguida, um colo curto e mais delgado e o estróbilo com 800 a 900 proglotes. As proglotes mais jovens, próximas ao colo são mais largas e as maduras, há um metro do escólex, são mais compridas. Nos anéis grávidos, o útero estará repleto de ovos, 30 a 50 mil, apenas parte deles madura. Desde a ingestão da forma larvária até a postura de ovos decorre um período de 2 a 3 meses. A longevidade estimada do verme adulto é de duas décadas (apud VAZ, 1996).

A fase embrionária é determinante na dinâmica da transmissão. Os ovos têm a forma subesférica, 30 – 40 μ de diâmetro, cor acinzentada, contendo em seu interior uma massa granulosa com três pares de acúleos, o embrião hexacanto ou oncosfera. Os ovos apresentam elevada resistência às condições ambientais (apud HENRY, 1995). A casca é espessa e estriada radialmente. A parede espessa de natureza quitinosa-cálcarea do ovo é parcialmente digerida pelo suco gástrico e no intestino delgado é liberado o embrião hexacanto que, ganhando a corrente circulatória por meio de seus acúleos, pode alcançar todos os tecidos e órgãos, onde se desenvolverá em cerca de três meses até a forma larvária (VAZ & LIVRAMENTO, 1996; apud VAZ, 1996).

A fase larvária da *T. solium*, *Cysticercus cellulosae*, consiste de uma vesícula semi-transparente, contendo líquido e o escólex, formando um canal espiralado e uma cabeça ou rostro com quatro ventosas rodeando uma coroa dupla com 24 – 32 acúleos. A membrana da vesícula é a estrutura que interage diretamente com o hospedeiro e protege o escólex que evagina por ação de sucos biliares e pH neutro. Consiste de três camadas: tegumento, subtegumento e parênquima composto de um sistema complexo de canalículos em contato com o líquido vesicular que contém

sais, proteínas e glicose. A espessura da membrana de 70 a 100 μ e as microvilosidades que aumentam cerca de 136 vezes a área total são importantes para funções da larva relacionadas ao meio ambiente, alimentação, excreção e evasão do sistema imunológico do hospedeiro (VAZ, 1996).

Na dinâmica da transmissão da cisticercose animal e humana alguns fatores estão envolvidos: fatores extrínsecos (umidade, temperatura ambiente, agentes dispersos dos ovos), fatores sócio - econômicos (práticas de criação de suínos, comportamento alimentar, legislação, fiscalização e educação sanitária) e fatores intrínsecos (potencial biótico do parasita e imunidade natural e adquirida dos hospedeiros) (VAZ, 1996).

PATOGENIA

As localizações mais freqüentes dos cisticercos no ser humano são músculos estriados, sistema ocular e sistema nervoso central (SNC), sendo a forma nervosa, neurocisticercose (NC), considerada a de maior importância clínica, com graves sintomas como epilepsia, quadros psíquicos e demenciais e aumento de pressão intracraniana, este último responsável pela elevada letalidade (MACHADO et al., 1988).

De modo geral, os parasitas permanecem por meses e até anos sem determinar processos importantes de lesão tecidual e nesse período pouco se conhece sobre os antígenos excretados e secretados pelo cisticerco. Quando da morte e degeneração do parasita, observa-se intensificação da resposta imune e da inflamação com conseqüente agressão tecidual, que pode passar como branda até seqüelas irreversíveis ou morte (VAZ & LIVRAMENTO, 1996).

A reação inflamatória desenvolve-se em volta do cisto, caracterizada pela presença de linfócitos, plasmócitos e eosinófilos; e é responsável por eventual destruição do parasita dentro de um nódulo calcificado. No entanto, o rigor da resposta inflamatória é muito variável conforme a fase evolutiva dos cisticercos (SPINA-FRANÇA, 1969; DEL BRUTO et al., 1988). Na fase

inflamatória, são encontrados anticorpos em elevados níveis no líquido cefalorraquiano (LCR), correspondendo a marcadores de diagnóstico diferencial na vigência de sintomas neurológicos (VAZ & LIVRAMENTO, 1996).

EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de cisticercose, e cerca de 50 mil morrem todos os anos (CANTÚ & BARINAGARREMENTERIA, 1996). A cisticercose é considerada endêmica em regiões carentes como México, América Latina, Ásia, África, China e Indonésia. Na Europa, foi praticamente erradicada através da aplicação de leis sanitárias, educação sanitária e efetiva inspeção em matadouros. Ao contrário, no México e em outros países em desenvolvimento, persistem condições favoráveis para a manutenção do ciclo biológico: mais de 40% dos suínos consumidos no México são de origem de áreas onde o saneamento é precário e com inspeção inadequada de carnes para consumo humano (McMANUS, 1990; BRUCK et al., 1991; VALDEZ et al., 1994; WHITE, 1996). A cisticercose representa importante problema de Saúde Pública pela elevada incidência, devido à gravidade dos quadros clínicos e pela precariedade de recursos terapêuticos específicos (VAZ et al., 1990). É considerada um problema também nos Estados Unidos devido à imigração de indivíduos de origem de áreas endêmicas (GRISOLIA & WIEDERHOLT, 1982; SOUSA et al., 1998; TOLEDO et al., 1999). Supõe-se que no Brasil a alta taxa de infecção ocorra por práticas inadequadas de suinocultura predominantemente em áreas rurais (VIANNA et al., 1986).

Não há disponibilidade de dados sobre a situação real do complexo teníase-cisticercose em nosso país, mas pode-se inferir que deve ser endêmica em regiões carentes e de controle sanitário inexistente ou precário. As correntes migratórias, a longa evolução da infecção humana e a transmissão por ovos de *T. solium* indicam que casos de cisticercose possam ser encontrados, também, nos grandes centros urbanos e entre

grupos de boas condições sócio-econômicas (MACHADO et al., 1988).

No Brasil, a maioria dos estudos da cisticercose humana restringem-se em centros especializados, sendo relatada particularmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A incidência de cisticercose tem sido considerada baixa no nordeste brasileiro, porém este fato se deve certamente à falta de diagnóstico da cisticercose (TAKAYANAGUI & JARDIM, 1983; MACHADO, 1987; SPINA-FRANÇA et al., 1993; ALBUQUERQUE & GALHARDO, 1995). Os estados da Bahia, Maranhão, Pernambuco, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte são consideradas áreas com casos ocasionais de cisticercose (AGAPEJEV, 1996). Com a utilização de exames de imagem, o diagnóstico da cisticercose também vem sendo relatado nos estados do Paraná, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (LIVRAMENTO comunicação pessoal).

A partir de estudo soroepidemiológico realizado em Brasília, foi encontrada a frequência de anticorpos anti-cisticercos em 5,2% de 1.122 indivíduos estudados (VIANNA et al., 1986).

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 7 anos (1979 a 1985), foram diagnosticados 260 casos de cisticercose, correspondendo a 0,2% do total de pacientes atendidos no período (MACHADO et al., 1988).

A escassa divulgação dos dados obtidos no Serviço de Inspeção Federal e nos Laboratórios de Saúde Pública também contribuem para a ausência de um programa de controle dessa zoonose. Com o estudo realizado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, de 1960 a 1989, avaliando-se portanto 30 anos, DIAS et al., 1991, encontraram 0,5% de frequência de presença de ovos de *Taenia* sp em amostras de fezes. Foi possível identificar a espécie em algumas amostras, 12,22% para *T. solium* e 87,80% para *T. saginata*.

VAZ et al., 1990, estudaram a frequência de anticorpos anti-*T. solium* em 1.264 amostras de soro de indivíduos de cinco municípios do estado de São Paulo, observando a frequência de positividade de 2,30%, 0,82%, e 5,00% respectivamente para soros de 821 adultos e 243 crianças da

população geral e 200 pacientes adultos internados em hospital psiquiátrico.

Em revisão de 34 casos de NC em crianças (15 meses a 13 anos), os exames de imagem mostraram-se mais efetivos na detecção dos cistos (positividade em 33 dos 34 pacientes), confirmados também pelos exames laboratoriais de fixação de complemento ou imunofluorescência, com positividade de 77% (20/26 pacientes) em LCR e 78% (18/32 pacientes) em amostras de soro (BRUCK et al., 1991).

BONAMETTI et al., 1992, realizaram análise de 50 pacientes com epilepsia em três Serviços de Neurologia do Município de Londrina, Paraná e os resultados mostraram 34,0% de positividade em LCR e 20,0% em soro.

LONARDONI et al., 1996, realizaram inquérito sorológico em cinco municípios da região Norte do Estado do Paraná, mostrando que em 2.180 indivíduos, 69 (3,2%) apresentaram títulos significativos de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae*.

A letalidade da forma neurológica ainda é elevada, cerca de 20%, e acredita-se que o número de casos assintomáticos, não submetidos a critérios diagnósticos específicos, também seja elevado (VAZ et al., 1990; SOUSA et al., 1998).

PROFILAXIA

A Organização Mundial da Saúde recomenda as seguintes medidas para início de um programa de controle da teníase-cisticercose: a detecção e o tratamento de todos os casos de teníase e a melhoria das condições sanitárias, inclusive de educação; e para a prevenção de novos casos, o tratamento adequado de água e rações para animais, aliado a medidas de inspeção de alimentos de origem animal para consumo humano (MAHAJAN, 1982; DIAS et al., 1991). Considerando que as principais medidas de controle do complexo teníase-cisticercose são o diagnóstico e tratamento do portador do verme adulto, fiscalização das criações de suínos e condições sanitárias que impeçam a contaminação fecal da água e alimentos pode-se afirmar que a cisticercose é antes de tudo um problema sanitário

perfeitamente evitável (VAZ, 1996).

ASPECTOS CLÍNICOS

A NC ora se apresenta como afecção aguda grave (meningoencefalite, edema cerebral, bloqueio ventricular, amolecimento isquêmico por endarterite), ora como subaguda ou crônica (especialmente as formas convulsivas puras). Em muitos casos não ocorre a reação inflamatória em volta do cisticerco evidenciando a imuno-tolerância desenvolvida pelo hospedeiro (CANELAS, 1962). As manifestações clínicas causadas pela *T. solium* dependem não somente da localização, mas também do número de parasitos e de seu estágio de desenvolvimento e de características individuais do paciente (NEVES, 1987).

Os modelos fisiopatogênicos de infecção do SNC são: sistêmicos com comprometimento da barreira hemato-encefálica, modelo local no qual a defesa depende apenas de recursos imunológicos do SNC e o modelo intermediário (misto). A NC é o melhor exemplo do modelo local com surtos de agudização ocorrendo quando da morte e degeneração do parasita, com liberação maciça de antígenos, quadro clínico meningítico e exacerbação da resposta imune detectada no LCR (SPINA-FRANÇA et al., 1993).

SOTELO et al., 1985, classificaram a cisticercose de acordo com a fase do parasita em forma ativa e inativa. Na forma inativa podem predominar as imagens de cistos calcificados. Na forma ativa observa-se, nos exames de imagem, reação inflamatória em torno do cisticerco (FLISSER et al., 1988).

A partir da análise de exame de imagem realizada por tomografia computadorizada (TC) de pacientes tratados com praziquantel, procurando-se estabelecer correlação entre as imagens observadas na TC e a evolução biológica dos cisticercos, foi proposta uma nova classificação: tipo I que não apresenta alterações no exame de imagem, tipo II em que ocorre a presença de cistos íntegros; tipo III em que há ocorrência de cistos em fase de degeneração e resposta inflamatória; tipo IV em que são encontrados cistos

calcificados e tipo V, chamado de misto, em que são encontrados cistos em diferentes estágios de evolução (MACHADO et al., 1990).

TRATAMENTO

É especialmente para evitar a agressão ao SNC que se justificam tentativas de terapêutica dirigidas diretamente ao parasita na cisticercose, além da finalidade de desencadear o menor número possível de episódios de reação inflamatória, na medida em que ocorre morte e degeneração de todos os parasitas (SPINA-FRANÇA & NÓBREGA, 1981).

No final da década de 1970, foi introduzido o praziquantel no tratamento medicamentoso da NC, o qual tem-se mostrado satisfatório em certas formas da doença (LIVRAMENTO, 1987). A utilização do praziquantel, medicamento capaz de interferir nas condições biológicas do parasita, pode provocar o aparecimento do fenômeno de exacerbação da síndrome do LCR na NC, assim como o rompimento das vesículas do cisticercos durante intervenções neurocirúrgicas, resultando em aparecimento de pleocitose e eosinofilia. O uso concomitante de corticóides, diminui este tipo de crise (SPINA-FRANÇA e REZENDE, 1982; MACHADO, 1987; COOK, 1988; ROLFS et al., 1995).

O albendazol, outra droga parasiticida, apresenta vantagens econômicas no tratamento (MACHADO, 1988). TAKAYANAGHI & JARDIM, 1992, em estudo comparativo utilizando os dois fármacos, demonstraram ligeira vantagem da utilização do albendazol em relação ao praziquantel na redução total de cistos identificados pela tomografia computadorizada (88% vs. 50%).

Dependendo da localização e do número dos cisticercos presentes no homem o tratamento cirúrgico pode ser recomendável. Entretanto, é um procedimento de risco, devendo a análise de benefícios ser clinicamente estabelecida (NEVES, 1987).

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da NC é difícil devido aos sintomas polimórficos, semelhantes a outras afecções do SNC, principalmente nas fases de reagudização do processo imune-inflamatório. O diagnóstico da NC é baseado em critérios clínicos e laboratoriais, além de diagnóstico radiológico.

Exames Radiológicos

A tomografia axial computadorizada (TC) e a ressonância magnética nuclear (RMN) são métodos eficientes para visualização e localização dos cisticercos em todas as fases da doença, bem como da resposta inflamatória que os circunda, mas são técnicas muito caras e inacessíveis para a maior parte da população atingida (DIAZ et al., 1992).

Por meio de TC e RMN é possível avaliar a morfologia do cisticerco, atividade e a natureza da resposta inflamatória. Os exames de neuroimagem permitem seguir o curso natural da doença, além das modificações clínicas ou tratamentos cirúrgicos (OVERBOSCH, 1992; LIVRAMENTO et al., 1993; GARCIA et al., 1994).

Exame Anatomopatológico

Os nódulos subcutâneos, eventualmente encontrados nos pacientes, permitem que se proceda facilmente a biópsia e exame histopatológico. A confirmação de cisticercose subcutânea pode ser elemento importante no esclarecimento de quadros neurológicos (REY, 1991).

Na análise de 64.911 protocolos de exames anátomo-patológicos em Brasília, o diagnóstico da cisticercose foi observado em 30 (0,05%) casos, sendo que em 27 (90,0%) destes os cistos estavam nos tecidos músculo-cutâneo-mucoso, 1 (3,3%) no gânglio e 2 (6,7%) no Sistema Nervoso Central (VIANNA et al., 1991).

Em alguns casos, o diagnóstico é feito somente durante cirurgia ou necrópsia (SPINA-FRANÇA, 1962; MONTENEGRO et al., 1994).

Aplicação da Biologia Molecular

Técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas para se verificar a reatividade cruzada que existe entre as *Taenias*. A obtenção de proteínas recombinantes podem auxiliar e servir de fonte alternativa de antígenos com utilização em diagnóstico.

Alguns autores estudaram o potencial uso de proteínas recombinantes, em vacinação. JOHNSON et al., 1989 com a extração de mRNA da *T. ovis* em experimentos preliminares, demonstraram maior reatividade dos antígenos de massa molecular encontrados entre 47-52kD. Os genes extraídos desta região foram utilizados para triagem da biblioteca genômica. As proteínas de fusão (GST-45S e GST-45W) foram ensaiadas para verificar a indução de imunidade em ovelhas, gerando imunidade parcial contra a infecção por *T. ovis*, descrevendo-se pela primeira vez a identificação de um antígeno recombinante para cisticercos.

FISHER et al., 1994, obtiveram o cDNA de *T. crassiceps*, expresso em lambda gt 11, em que os primeiros clones foram submetidos à triagem com soro de coelho anti-*T. solium* e anti-*T. saginata*. Verificaram que 22 clones expressaram a proteína de fusão β -galactose (com peso molecular de aproximadamente 118-132kD), e foram reagentes para anticorpos da classe IgG. Dos 22 clones, 15 foram subclonados em plasmídeos pGEX-2T (modificado) e pT7T3 α 19 e a sequência de cDNA pôde ser determinada em 4 e 5 clones, respectivamente.

Em veterinária, a cisticercose bovina causada pela *T. saginata* também apresenta-se como grande problema. Com a obtenção de cDNA de *T. crassiceps*, foi possível o diagnóstico da cisticercose, no qual com a clonagem e expressão da sequência homóloga de cDNA da *T. crassiceps* – obteve-se o antígeno TcA2-MBP, uma proteína recombinante de 10kD que foi ensaiado em ELISA, e reagiu com soro de gado infectado

experimentalmente com *T. saginata*, mostrando a possibilidade de uso de antígenos recombinantes no diagnóstico da cisticercose bovina (ZARLENGA et al., 1994).

CHAPMAN et al., 1995, utilizaram sondas específicas, que auxiliaram na diferenciação de ovos de *T. solium* e *T. saginata* pela amplificação de DNA de ovos ou proglotes encontrados em amostras de fezes.

TOLEDO et al., 1999, descreveram a obtenção de um antígeno recombinante de cisticercos de *T. crassiceps* denominado KETc7, que apresentou um grande potencial em vacinação experimental de camundongos Balb/c infectados experimentalmente. Este peptídeo sintético parece ser um forte candidato a ser utilizado em vacinação para a cisticercose suína, mas ainda precisa ser avaliado.

CHUNG et al., 1999, clonaram um antígeno de 10kD de *T. solium* que foi utilizado no diagnóstico da NC. Este antígeno mostrou 73% de homologia com o antígeno de 10kD de *T. crassiceps*. A proteína recombinante mostrou sensibilidade de 97% e especificidade de 98% em imunoblot na análise de 219 amostras de soro de pacientes com NC.

Métodos Imunológicos de Diagnóstico

Os métodos imunológicos de diagnóstico da NC têm sido amplamente aplicados, já que, em função da localização do parasita, há restrições para o diagnóstico direto (VAZ & LIVRAMENTO, 1996).

Pesquisa de Antígenos

A pesquisa de antígenos ampliaria as perspectivas de diagnóstico da NC, com aumento de sua sensibilidade, uma vez que os antígenos, principalmente de excreção e secreção, apareceriam antes da produção de anticorpos. Entretanto, as técnicas para detecção de antígenos requerem melhor avaliação e ainda não estão disponíveis na rotina laboratorial (VAZ & LIVRAMENTO, 1996).

A detecção de antígenos na cisticercose humana tem sido descrita utilizando técnicas de aglutinação, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), e ensaios imunoenzimáticos por imunoblot e ELISA com uso de anticorpos monoclonais e policlonais.

TELLEZ-GIRON et al., 1987, demonstraram que 59% de 17 amostras de LCR de pacientes com NC continham antígenos, detectados pela técnica de Dot-ELISA e 77% por ELISA. Caracterizaram por SDS-PAGE e imunoblot o antígeno protéico de massa molecular de 66kD.

VELASCO-CASTREJÓN et al., 1989, detectaram antígenos de *T. solium* em 88% de 215 amostras de LCR de pacientes com NC utilizando a técnica de aglutinação de partículas de látex adsorvidas com imunoglobulinas anti-líquido vesicular, anti- excreção/secreção e anti-extrato total de cisticercos de *T. solium*. Os autores obtiveram maior positividade empregando soro anti-líquido vesicular.

ESTRADA et al., 1989, identificaram dois antígenos de peso molecular de 190 e 230kD, presentes no LCR de 14 das 18 amostras de pacientes com suspeita de NC, correspondentes aos antígenos com mesmo peso molecular presentes no líquido vesicular do cisto.

CHOROMANSKI et al., 1990, detectaram antígenos larvais em amostras de LCR de pacientes com suspeita de NC, utilizando HPLC. As amostras de LCR fracionadas revelaram 6 diferentes picos, que foram ensaiados por ELISA. Em 44 das 79 amostras de LCR foram identificados antígenos de peso molecular de 110kD no pico 2 e em 23 destas 44 amostras também foram revelados antígenos no pico 1 (> 400kD).

Na teníase humana, os antígenos de *T. solium* puderam ser identificados em amostras de fezes, que após purificação por HPLC, mostraram ser uma proteína de 60kD. Esta proteína foi reativa no imunoblot, quando ensaiada com anticorpo policlonal anti-*T. solium*. A proteína isolada pareceu ser o maior componente antigênico encontrado em fezes contendo ovos de *T. solium*. Os autores sugerem a obtenção de antígenos de secreção/excreção a partir de cultivo do verme adulto. No entanto, a manutenção da *T. solium* "in vitro" não é exeqüível (MAASS et al., 1992).

A dificuldade de detecção de antígenos larvais em LCR pode estar relacionada à baixa concentração dos mesmos, degradação antigênica ou liberação de antígenos desconhecidos.

Em veterinária, técnicas para a detecção de antígenos de secreção/excreção também poderá proporcionar uma melhor correlação com a presença de parasitas viáveis, já que as técnicas para a detecção de anticorpos anti-cisticercos propostas como alternativa à inspeção de carnes não distingue a atividade dos cistos (viáveis ou não viáveis) (FLISSER et al., 1989; BRANDT et al., 1991; DRAELANTS et al., 1995a; ONYONGO-ABUJE et al., 1996; FAN et al., 1997).

A pesquisa de antígeno permanece como área de investigação de interesse na NC (VAZ & LIVRAMENTO, 1996).

Aplicação de Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais podem representar uma importante e potente ferramenta no auxílio ao diagnóstico da cisticercose humana e animal.

A obtenção de antígenos purificados utilizando anticorpos monoclonais conjugados a coluna de afinidade de Sepharose foi proposta por NASCIMENTO et al., 1987. Os autores utilizaram uma proteína de escólex de *T. solium*, obtendo-se ao final três diferentes antígenos que foram utilizados em ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-*T. solium* em pacientes com NC.

Para o diagnóstico da cisticercose humana, o anticorpo monoclonal anti- *T. saginata* foi utilizado na detecção de antígenos em LCR de pacientes com NC (CORREA et al., 1989) e em amostras de soro de suínos com cisticercose (RODRIGUEZ-del-ROSAL, et al., 1989).

Utilizando-se anticorpos monoclonais, cisticercos de *T. saginata* e *T. solium* foram reconhecidos em sua porção carboidrato, presente na superfície do parasita. Foram encontradas também glicoproteínas em soro de hospedeiros infectados (PARKHOUSE & HARRISON, 1989).

HARRISON et al., 1989, obtiveram um anticorpo monoclonal reativo contra um epítipo composto de glicoproteínas encontrado na superfície e em secreções de cistos de *T. saginata*. Este anticorpo monoclonal foi utilizado em ELISA para detectar antígenos em soro de animais infectados.

BRANDT et al., 1992, obtiveram dois clones que apresentaram reatividade cruzada na identificação de antígenos circulantes em soros de humanos e suínos infectados por *T. solium*.

Anticorpos monoclonais também foram avaliados por CHANG-YUAN et al., 1992, na detecção de antígenos circulantes em 116 amostras de LCR de pacientes com NC, sendo que em 97 amostras foi possível a detecção de antígenos circulantes. Os resultados sugerem que a pesquisa de antígenos circulantes utilizando anticorpos monoclonais pode auxiliar no diagnóstico da cisticercose.

DRAELANTS, et al., 1995b, utilizando anticorpos monoclonais para *T. saginata* caracterizaram as faixas de peso molecular de >200kD e 40-60kD para antígenos de *T. saginata*, além da aplicação dos anticorpos monoclonais em testes imunohistoquímicos. Pela técnica de Dot-ELISA com anticorpo monoclonal anti-*T. saginata*, observaram reatividade cruzada em soro de suínos infectados com cisticercose, sugerindo a possível utilização dos mesmos anticorpos monoclonais para o estudo da cisticercose suína.

Pesquisa de Anticorpos

Os métodos imunológicos para detecção de anticorpos anti-*T. solium* em LCR desenvolveram-se no início do século, desde reações de precipitação, e a reação de fixação de complemento (RFC) padronizada para soro de animais por WEINBERG, em 1909 na França. MOSES em 1911, utilizando a RFC, demonstrou a presença de anticorpos anti-*T. solium* em amostras de LCR, sendo este o primeiro teste a ser utilizado sistematicamente no diagnóstico da cisticercose (LIVRAMENTO et al., 1993).

LANGE, 1940, e SPINA-FRANÇA, 1956, já demonstraram a

importância da NC em nosso meio e o valor do exame do LCR no estabelecimento do diagnóstico e na avaliação da eficácia de medidas terapêuticas utilizadas. Desde então, o desenvolvimento de métodos e a detecção de outros marcadores têm contribuído para a compreensão de vários dos fenômenos imunobiológicos dessa complexa relação parasita-hospedeiro. As técnicas de hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, radioimunoensaio e testes enzimáticos como o ELISA e imunoblot são empregadas no diagnóstico. Esses dois últimos ensaios apresentam vantagens técnicas quando comparadas as técnicas de radioimunoensaio que estão sujeitas aos riscos operacionais (MOHHAMAD et al., 1984, BASSI et al., 1991; LIVRAMENTO et al., 1993; VAZ et al., 1997).

Considerando que o diagnóstico clínico da cisticercose sempre é um problema devido à variedade e não especificidade dos sintomas apresentados pelo paciente, um rápido e simples diagnóstico é necessário, para acompanhamento epidemiológico da doença. Por esta razão, os testes imunológicos são importantes tanto para o diagnóstico como para estudos epidemiológicos, principalmente quando não há disponibilidade de exames de imagem (ESPINOZA et al., 1986; PAMMENTER et al., 1987; KUNZ et al., 1989).

De todos os exames disponíveis, o que fornece maior número de elementos para o diagnóstico, é o exame de LCR, uma vez que a cisticercose determina freqüentemente alterações do LCR, com características que sugerem processo inflamatório crônico (REY, 1991).

Apesar dos testes imunológicos utilizados para o diagnóstico da cisticercose terem sido bastante desenvolvidos, ainda apresentam falhas, seja pela falta de sensibilidade ou de especificidade, ou de ambas. Resultados falso-positivo ou falso-negativo em amostras de soro de pacientes infectados por cisticercos, têm sido observados. Muitos motivos podem ser atribuídos a estes resultados, como a não resposta do paciente e preparações inadequadas de antígeno (NASCIMENTO et al., 1987, ITO et al., 1998).

O custo e o tempo despendido para a realização dos testes são

fatores importantes e determinantes no desenvolvimento dos mesmos. A técnica de imunoblot é cara e complexa, inadequada a grandes rotinas, especialmente em países em desenvolvimento em que a cisticercose é endêmica (PLANCARTE et al., 1994).

Um dos aspectos importantes nesses testes é a escolha do antígeno adequado para obtenção de melhor eficiência diagnóstica, já que a utilização de preparações antigênicas não purificadas podem apresentar reatividade inespecífica ou cruzada, principalmente em amostras de soro de paciente com outras parasitoses.

Diversos autores já descreveram a utilização de preparações antigênicas purificadas ou deslipidadas, sem melhoria do desempenho dos testes (ESPINOZA et al., 1982; MOHAMED et al., 1984; ESPINOZA et al., 1986). Estudos recentes demonstraram a importância da utilização de extratos purificados principalmente das frações glicoprotéicas, nos ensaios imunológicos para a detecção de anticorpos anti-*T. solium* (GROGL et al., 1985; ESPINOZA et al., 1986; TSANG et al. 1989; FELDMAN et al., 1990, ITO et al., 1998, BUENO et al., 2000).

Os parasitas possuem abundantes glicoproteínas em sua membrana de superfície, encontradas em diferentes estágios de desenvolvimento, assim como também no líquido vesicular das larvas. As glicoproteínas são fortemente imunogênicas e podem ser utilizadas para o desenvolvimento de testes imunológicos de diagnóstico. As proteínas de superfície dos parasitas parecem estar envolvidas na resistência ou susceptibilidade do ataque do hospedeiro ao parasita. Entretanto, pouca informação está disponível a respeito da natureza bioquímica e identificação imunológica dessas glicoproteínas (LANDA et al., 1994).

PARKHOUSE & HARRISON, 1987, analisaram as proteínas especificamente associadas à superfície das *T. solium*, *T. saginata* e *T. crassiceps*, com o uso das técnicas de marcação direta, por meio de coluna de cromatografia de afinidade com lentil-Sepharose 4B e SDS-PAGE. Dois tipos de extratos antigênicos foram analisados, adsorvidos e não adsorvidos à coluna de lentil. Os resultados demonstraram que a maior

parte dos antígenos de superfície eram glicoproteínas.

TSANG et al., 1989, caracterizaram um grupo de glicoproteínas de *T. solium*, utilizando a técnica de coluna de afinidade de lentil-lectina, para o diagnóstico da cisticercose humana. Pelo teste de imunoblot, sete frações foram mais comumente reconhecidas pelos soros de pacientes com cisticercose: as GP50kD, GP42-39kD, GP24kD, GP21kD, GP18kD, GP14kD e GP13kD, em que as GP42kD e GP24kD foram as mais freqüentes. Foram obtidas especificidade de 100% e sensibilidade de 98% nos testes realizados.

Utilizando-se glicoproteínas de *T. solium* em ELISA e imunoblot, amostras de saliva e soro de pacientes com NC foram comparadas quanto à presença de anticorpos. Nas amostras de saliva, as frações mais reconhecidas foram as GP42kD, seguida da GP13kD e GP50kD, enquanto que as menos observadas foram as GP18kD e 14kD (FELDMAN et al., 1990).

BAUMEISTER et al., 1992, realizaram estudo comparativo da fração glicolipídica encontrada em *T. solium*, *T. saginata* e *T. crassiceps*. Os autores observaram padrões diferentes entre as espécies, devido à heterogeneidade dos lipídeos. Em sorologia, demonstrou-se a mesma reatividade com soro normal de camundongo, soro de animais infectados e com anticorpo monoespecífico e com anticorpo policlonal contra componentes de *T. crassiceps* (DENNIS & WIEGANDT, 1992).

Com a proposta de purificação e parcial caracterização estrutural destas glicoproteínas na superfície de *T. solium*, utilizando extrato total fracionado com Concanavalina A por cromatografia de afinidade, foram obtidas seis frações de pesos moleculares de 180kD, 103kD, 96kD, 68kD, 55kD e 45kD; e a fração de 55kD foi encontrada na maior parte da superfície do cisto, além de corresponder a cadeia pesada da imunoglobulina IgG de suínos pelo imunoblot (LANDA et al., 1994).

PLANCARTE et al., 1994, empregando as técnicas de ELISA e Dot-blot demonstraram a reatividade de uma glicoproteína, a GP24 (TSANG et al., 1989) em amostras de LCR e soro no diagnóstico da NC. A GP24 foi

obtida a partir da purificação por SDS-PAGE, sendo o eluato utilizado na imunização de coelhos e os soros imunes somente reconheceram esta fração. A utilização da GP24 em ELISA e Dot-blot foi bem sucedida e pode facilitar o diagnóstico da NC.

RODRIGUEZ-CANUL et al., 1997, utilizaram glicoproteínas obtidas do extrato total de *T. solium* (TSANG et al., 1989) em imunoblot para a pesquisa de anticorpos no diagnóstico da NC, apresentando 95% de sensibilidade. A sensibilidade de cada GP foi para GP50 - 84%, GP42-39 - 91,2%, GP24 - 91,2%, GP21 - 66%, GP18 - 14%, GP14 - 50,8% e GP13 - 73,6%. Todas as amostras apresentaram resultado positivo com o antígeno glicoprotéico, inclusive duas amostras que foram negativas quando ensaiadas com o antígeno total de *T. solium* e reconheceram as GP50, GP18, GP14 e GP13.

Com o uso de cromatografia de focalização isoeletrica de cistos de *T. solium*, foram isoladas duas frações F16 e F17, que não apresentaram reatividade cruzada com amostras de soro de pacientes com outras parasitoses, avaliadas por ELISA. Esses dados sugerem que essas frações apresentem maior especificidade para o diagnóstico da cisticercose (KO & NG, 1998a/b).

ITO et al., 1998, por meio da técnica de focalização isoeletrica, obtiveram frações glicoprotéicas mais específicas do que as obtidas por purificação em colunas de cromatografia (TSANG et al., 1989). Considerando mais específicas as frações encontradas no pico 19 (pH 9,2) e pico 18 (pH 9,4), os autores observaram que as frações obtidas do antígeno total ou de líquido vesicular contém pelo menos três grandes faixas de peso molecular entre 10 a 26kD, com vantagem de apresentarem baixa reatividade cruzada com outros parasitas, especialmente *Echinococcus* spp. A utilização das glicoproteínas também apresentam a vantagem de possibilitar a obtenção de componentes específicos.

Mais recentemente, ITO et al., 1999, demonstraram a utilização de glicoproteínas para o diagnóstico da cisticercose suína. Todas as amostras de soro analisadas apresentaram similar padrão de reatividade com as

bandas de 10 e 26kD.

UTILIZAÇÃO DE ANTÍGENO HETERÓLOGO

A dificuldade no estudo de testes imunológicos de aplicação na NC é a obtenção de parasitas de suínos naturalmente infectados, dos quais obtém-se o antígeno de *T. solium*, devido à falta de homogeneidade que os lotes apresentam e pela menor quantidade deste tipo de antígeno.

Em 1962, foram obtidos cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF (Ontario Research Foundation), cestóideo de raposas. Os cisticercos são de fácil manutenção em laboratório, mantidos em peritônio de camundongos (FREEMAN, 1962; DORAIS, 1969).

A forma larvária caracteriza-se por reprodução assexuada por brotamentos a partir da membrana. Devido às suas propriedades biológicas é um importante modelo de laboratório pelas possibilidades de efetuar estudos sobre a interação hospedeiro-parasita e de preparações antigênicas utilizadas no diagnóstico imunológico e como possível constituinte de produto vacinal (SIEBERT et al., 1980; LARRALDE et al., 1990; VAZ, 1993; ANDRADE et al., 1996).

A análise dos extratos antigênicos de *T. crassiceps* por SDS-PAGE, identificou 19 peptídeos de membrana de peso molecular entre (245 a 24kD) e em líquido vesicular identificou 26 peptídeos (200 a 22kD), em que cerca de 50% das frações eram constituídas de glicopeptídeos (VAZ, 1993).

VAZ et al., 1997, verificaram a reatividade cruzada entre os antígenos de líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) e o extrato de cisticercos de *T. solium*, utilizando amostras de LCR de pacientes portadores de NC. Por imunoblot, verificou-se que os peptídeos de 72-68kD e 95-92kD eram imunodominantes no extrato LV-Tcra. Assim, foram padronizados os testes Dot-ELISA (VAZ et al., 1996) e hemaglutinação indireta (FERREIRA et al., 1997), utilizando esse antígeno com resultados comparáveis ao uso de antígeno homólogo. A reatividade cruzada

observada entre os extratos antigênicos confirmou que os parasitas apresentam importantes epítomos, presentes em concentração suficiente para serem usados como fonte alternativa de antígenos em testes imunológicos para detecção de anticorpos em amostras de LCR na NC.

O antígeno de cisticercos de *T. crassiceps* pode também substituir o uso do antígeno de *T. solium* no diagnóstico da cisticercose suína. O antígeno heterólogo de *T. crassiceps* foi utilizado na análise de 628 amostras de soros de suínos por meio de ELISA; e destas, 195 amostras foram ensaiadas no imunoblot. No ELISA foram obtidas sensibilidade de 76,9% e especificidade de 97%. O imunoblot revelou sensibilidade de 100% e especificidade 96,7% e para o diagnóstico da cisticercose suína foram considerados peptídeos específicos os de peso molecular de 68-72kD, 36-39kD, 23-25kD, 22kD, 21kD, 19-20kD, 17-18kD, 15-16kD e 14kD (PINTO,1998).

Recentemente, BUENO et al., 2000, demonstraram a especificidade dos peptídeos de 131kD, 121kD, 109kD, 74kD e < 62kD (62kD, 55kD, 47kD, 41kD, 39kD, 35kD, 30kD, 28kD, 25kD, 22kD, 19-13kD, e 12kD), para o antígeno LV-Tcra por meio de imunoblot aplicado a amostras de LCR e plasma de pacientes com NC. Os autores indicam a importância de purificar os peptídeos imunodominantes (19 – 13kD, 109kD, 55kD e 45kD) no antígeno LV-Tcra para empregá-los em testes rápidos como o ELISA que se mostra de alta inespecificidade frente a soros de outras parasitoses, quando se utiliza o antígeno bruto.

Não há na literatura citações sobre estudos utilizando antígenos glicoprotéicos obtidos de *T. crassiceps* para o diagnóstico da NC.

PROPOSIÇÃO

Considerando a importância de obtenção de antígenos específicos para o emprego em testes imunológicos:

O objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização das frações antigênicas purificadas de cisticercos de *Taenia crassiceps*, além da análise quanto à eficiência na detecção de anticorpos específicos em amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com neurocisticercose.

MATERIAL E MÉTODOS

1. OBTENÇÃO DE CISTICERCOS de *Taenia crassiceps*

Foi estudado o antígeno obtido a partir da forma larvária de *T. crassiceps*, cepa ORF (FREEMAN, 1962), cedida gentilmente em 1989, pelo Prof. Dr. Carlos Larraalde do Instituto de Investigaciones Biomédicas da Universidad Nacional Autónoma 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 200µl) de solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M pH 7,2 (PBS). A inoculação foi feita com o auxílio de agulhas hipodérmicas 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 após com solução salina, sendo desprezados aqueles em fase de degeneração ou calcificação.

2. EXTRATOS ANTIGÊNICOS

2.1. LÍQUIDO VESICULAR DE *Taenia crassiceps* (LV-Tcra)

Os cisticercos íntegros foram rompidos com auxílio de bastão de vidro e centrifugados a 15.000 x g, durante 10 minutos a 4°C. Foi retirado o sobrenadante e estocado, repetindo-se o processo com o sedimento. Os sobrenadantes foram reunidos e submetidos ao tratamento por ultra-som (Ultrasonic Power Unit – MSE, USA) em 4 ciclos de 30 segundos a 1mA e 20kHz, em banho de gelo. A mistura foi centrifugada duas vezes a 10.000 x 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 fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF Sigma Chem. Co., USA), na concentração final de 4×10^{-1} mM e, então, dividido em alíquotas e conservado a -20°C. (VAZ et al., 1997)

2.2. ANTÍGENO Concanavalina A (ConA-Tcra)

Os parasitas foram exaustivamente lavados por sedimentação em PBS contendo inibidores de proteases PMSF (Sigma Chem. Co., USA) e iodoacetamina (Sigma Chem. Co., USA). Os cisticercos foram homogeneizados (homogeneizador do tipo Porter PYREX Laboratory Glassware, Corning, USA), em banho de gelo, utilizando-se 20ml de PBS. O extrato foi submetido a tratamento por ultra-som 20khz e 1mA, por quatro períodos de 60 segundos, em banho de gelo e então centrifugado a 15.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi novamente centrifugado e foram adicionados inibidores de proteases PMSF e iodoacetamina, na concentração de 100µg (0,25mM). O extrato total salino foi dividido em alíquotas e conservado a -20°C.

O antígeno total foi passado em coluna de filtração em gel (PD-10 Sephadex G-25M) e posteriormente purificado por cromatografia de afinidade em coluna ConA-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals). O

material foi aplicado à coluna, equilibrada com tampão Tris/HCl pH 7,4 (NaCl 0,5M e Tris 0,05M), e eluído com solução alfa-metil-manopiranosídeo 0,2M. O pico protéico foi detectado por espectrofotometria a 280nm e concentrado por ultrafiltração em membrana YM-10 (AMICON).

2.3. ANTÍGENO PURIFICADO GLICOPROTÉICO (GP-Tcra)

O antígeno LV-Tcra foi concentrado em membrana YM-10 (AMICON) e purificado com auxílio de equipamento Prep-Cell modelo 491 (Bio Rad Laboratories Inc., Califórnia, EUA), em que na montagem e utilização do equipamento, foram seguidas as recomendações do fabricante.

Foram utilizados 20ml de solução de acrilamida a 12%, colocados em volta do cilindro de porcelana até alcançar 7,5cm e coberto com butanol e deixado em repouso durante 2 horas a temperatura ambiente. Após a polimerização do gel de separação, o butanol foi retirado e o gel foi exaustivamente lavado com água destilada, sendo coberto por tampão de corrida e deixado durante a noite em temperatura ambiente. O tampão de corrida foi retirado e montado o gel de empilhamento a 4% até alcançar 2,0cm. Após a polimerização, o extrato antigênico LV-Tcra contendo 14mg/ml de proteína foi tratado em tampão de amostra 2 vezes concentrado v/v (1ml de antígeno + 1ml de tampão) e foi aquecido durante 5 minutos a 100°C em banho fervente e aplicado no gel. A corrida eletroforética foi feita nas condições de 40-50mA/240 – 300V. Após 3 horas de corrida, as frações protéicas foram eluídas (1,0ml) e começaram a ser recolhidas em tubo (2,0ml/tubo). Após a coleta das frações, foi realizada detecção dos picos protéicos em espectrofômetro em comprimento de onda 280nm e analisadas as densidades ópticas. As frações foram processadas individualmente em SDS-PAGE a 12%, para obtenção somente das frações que apresentassem as faixas de peso molecular de 18 e 14kD. As frações que possuíam estas faixas de peso molecular foram reunidas e dialisadas por 48 horas em tampão bicarbonato de amônia 0,01M e depois mais 24 horas em tampão PBS pH 7,2. O antígeno foi

concentrado em polietilenoglicol 8000 (Sigma Chem. Co., USA), obtendo-se o extrato antigênico glicoprotéico de *T. crassiceps*, GP-Tcra

3. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ANTIGÊNICOS

Os antígenos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra foram caracterizados quanto à concentração de proteínas, polissacarídeos, composição de peptídeos em SDS-PAGE, interação com lectinas e efeito de tratamentos de pré-oxidação e enzimáticos.

3.1. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A dosagem protéica do antígeno LV-Tcra foi realizada pelo método de LOWRY et al., 1951, utilizando-se albumina bovina fração V (Sigma Chem. Com., USA) como padrão. Para os extratos antigênicos ConA-Tcra e GP-Tcra realizou-se a dosagem por meio de método comercial MICRO BCA PROTEIN ASSAY (Pierce Chem. Com., Rockford, Illinois, EUA).

3.2. DOSAGEM DE POLISSACARÍDEOS

A dosagem de polissacarídeos foi executada pelo método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), com adaptações.

A partir de curva padrão de açúcar (D-manose), os antígenos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra foram ensaiados em paralelo junto com um “branco” de reação. A todos os tubos foram acrescidos 1ml de fenol 80% e 5ml de ácido sulfúrico. Os tubos foram levemente agitados e colocados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. O produto da reação (200µl) foi colocado em placa de microtitulação e a intensidade de cor foi medida em espectrofotômetro para placas (Diagnostics Pasteur, Strasbourg-Schiltgheim, França), em comprimento de onda de 492 nm.

3.3. SDS-PAGE

Os reagentes e soluções utilizadas estão descritos no ANEXO I.

Os extratos antigênicos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo LAEMMLI, 1970. Para a montagem do gel foram utilizadas placas de 14,5cm de comprimento x 16,5cm de largura e 0,75cm de espessura e placas para mini-gel de 9,5cm de comprimento x 10cm de largura e 0,3cm de espessura.

Foi utilizado gel de separação a 15% ou gel gradiente de 7-20% e gel de empilhamento a 5% em sistema descontínuo.

Os extratos antigênicos LV-Tcra e ConA-Tcra foram aplicados, respectivamente, nas concentrações de 12 μ g/mm, 0,7 μ g/mm do pente. O antígeno GP-Tcra foi diluído a 1:50 ou a 1:20, conforme lote de antígeno utilizado. Os três antígenos foram tratados em tampão de amostra 5 vezes concentrado e aquecidos durante 5 minutos em água fervente. Foi utilizado padrão de peso molecular de 14,4 a 94kD, diluído em tampão de amostra 5 vezes concentrado (Pharmacia Biotech, Upsalla, Suécia).

A corrida eletroforética (BioRad Laboratories Inc., Califórnia, EUA) foi realizada com tampão de corrida pH 8,3, iniciada a 60V até a passagem da amostra do gel de empilhamento para o gel de separação, quando a voltagem foi aumentada e mantida a 150V e para mini-gel, a corrida eletroforética foi realizada a 50V para o gel de empilhamento e aumentada para 100V no gel de separação, até a chegada do marcador azul de bromofenol no final do gel.

Após o término da corrida eletroforética, foi realizada a coloração do gel por dois métodos: Coomassie Blue e prata.

Para a coloração com Coomassie Blue, o gel foi mantido durante 30 minutos em solução fixadora a temperatura ambiente e, em seguida, colocado em solução corante Coomassie Blue-R250 a 1% durante 3 a 5 minutos a 56°C. O gel corado foi tratado depois com solução descorante em 3 trocas de 10 minutos a 56°C e colocado em seguida em água destilada.

Para a coloração pela prata foi utilizado kit comercial (BioRad Laboratories Inc., Califórnia, EUA), em que foram seguidas as recomendações do fabricante.

3.3.1. TRANSFERÊNCIA

Na transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose de 0,2 μ (Milipore, USA), utilizou-se papel n^o1 (Whatman, England), em que foi feito um sanduíche com 6 papéis-filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel e mais 6 papéis-filtro, todos previamente embebidos em tampão de transferência por 20 minutos. A transferência eletroforética foi realizada durante uma hora a temperatura ambiente, com corrente de 50mA e voltagem constante de 17V (Bio-Rad Trans Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Mo – USA). A membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau-S a 0,5% (Serva Feinbiochemical, GmbH e Co. KG, Alemanha) para verificar a eficiência do procedimento de transferência e descorada com água destilada. Após secagem em estufa a 37°C foi guardada entre papéis de filtro a 4°C.

Foi também realizada a transferência para membrana de "polyvinylidene fluoride" (PVDF) de 0,1 μ (Milipore, USA), mergulhada durante 30 segundos em metanol (Merck, Schuchardt, Munchen, Alemanha) e depois em água destilada durante 2 minutos à temperatura ambiente. A montagem do sanduíche para a transferência foi realizada como descrita anteriormente. A transferência eletroforética foi realizada em cuba eletroforética (TE 42 Transphor Unit, Amerchan Pharmacia Biotech, New Jersey, USA) durante 16-18 horas a 4°C, com voltagem constante de 50V e 400mA. Em seguida a membrana foi corada com Ponceau-S a 0,5%, descorada com água destilada e armazenada entre papéis de filtro a 4°C.

3.4. BLOT LECTINA

As membranas de PVDF contendo os extratos antigênicos LV-Tcra e ConA-Tcra foram ensaiadas com as lectinas "*Canavalina ensiformes*" (ConA) e "*Bandeiraea simplicifolia*" (BS-I) (Sigma Chem. Co., USA), marcadas com peroxidase. A lectina ConA tem afinidade pelos açúcares glicose e manose e a BS-I pela galactose.

Não foi realizado blot lectina para o antígeno GP-Tcra.

Foram cortadas tiras de PVDF de 3mm, tratadas com albumina bovina a 4% (BSA fração V, Sigma Chem. Co., USA) em tampão acetado de sódio 0,1M pH 4,5, pré-oxidada com meta-periodato de sódio a 10mM durante 6 horas a temperatura ambiente e dialisada em PBS (GLASS et al., 1981).

As lectinas foram diluídas a 1:200 em BSA oxidada a 3%. Para a reação de competição de especificidade utilizou-se ConA diluída em solução de BSA oxidada a 3% com D-glicose a 0,3 M ou D-manose a 0,3 M. A lectina BS-I também foi diluída em BSA oxidada a 3% com galactose a 0,3M. Para a reação de pré-oxidação, a membrana foi pré-tratada com ácido periódico a 50mM em tampão acetato de sódio pH 4,5.

Os blots foram revelados com solução cromógena diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma Chem. Co., USA).

As membranas foram lavadas em água destilada e secas entre papel de filtro e os cálculos de R_f ("relative mobility") e PM foram efetuados segundo LAMBIN et al., 1976.

3.5. TESTE DE OXIDAÇÃO

A técnica ELISA foi utilizada para verificar o efeito da pré-oxidação sobre os antígeno LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra, segundo WOODARD et al., 1985.

Placas de 96 cavidades (NUNC) foram sensibilizadas com os antígenos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra, respectivamente, nas concentrações de 2µg/ml, 0,43µg/ml e 20µg/ml de proteína em solução tampão carbonato-bicarbonato a 0,05 M pH 9,6, mantidas 18 horas a

temperatura de 4°C. As cavidades das placas foram bloqueadas por 1 hora com BSA a 1% em PBS pH 7,2. Após rápida lavagem com tampão acetato de sódio a 50mM pH 4,5, foi adicionada solução de ácido periódico (Sigma Chem. Co., USA) variando-se sua concentração de 10mM; 50mM; 200mM, 1M e 2M em tampão acetato de sódio a 50mM pH 4,5, e as placas foram incubadas por 1 hora ao abrigo da luz a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram incubadas com boroidreto de sódio a 50mM (Sigma Chem. Co., USA), diluído em PBS pH 7,2 durante 30 minutos.

Para o ELISA foi utilizada uma amostra de soro positivo para NC, diluída a 1:100, amostras de LCR positivas para NC diluídas a 1:2 e incubadas durante 1 hora a 37°C. Como conjugado foi utilizada imunoglobulina de carneiro anti-IgG humana marcada com peroxidase (Biolab Diagnóstica SA, Jacarepaguá, RJ, Brasil), diluída a 1:4000. A reação enzimática foi revelada com adição de solução reveladora (substrato-cromógeno) com H₂O₂ (Sigma Chem. Co., USA) e o cromógeno utilizado foi o orto-fenileno-diamina (OPD) (Sigma Chem. Co., USA) durante 20 minutos ao abrigo da luz, seguida de bloqueio com ácido sulfúrico 4N e a densidade óptica (D. O.) foi medida em comprimento de onda de 492nm.

A porcentagem de oxidação foi calculada com a D.O. do teste com o antígeno pré-tratado dividido pela D.O. do teste com o antígeno sem tratamento, subtraída de 100%, ou seja, a oxidação foi avaliada em relação à perda de reatividade do antígeno (antigenicidade), verificando-se assim o efeito do tratamento sobre os epítomos antigênicos.

3.6. TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Os extratos antigênicos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra foram ensaiados em presença das enzimas proteinase K (Gigco BRL) e tripsina (Sigma Chem. Co., USA), segundo a técnica descrita por KAUR et al., 1985, com algumas modificações.

Os antígenos foram tratados com as enzimas proteolíticas proteinase K e tripsina, nas concentrações de 50µg/ml e 500µg/ml. No tratamento com

proteínase K essa incubação foi realizada em banho-maria a 63°C por 1 hora. No tratamento com tripsina a incubação foi a 37°C por 1 hora. Em seguida, os antígenos tratados foram usados para a sensibilização das placas de microtitulação nas concentrações de 2µg/ml, 0,43µg/ml e 20µg/ml de proteína para LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra, respectivamente. Para o teste, foi utilizada uma amostra de soro positivo para NC, diluído a 1:100 em BSA a 1%, incubado durante 1 hora a 37°C. Como conjugado foi utilizada imunoglobulina de carneiro anti-IgG humana marcada com peroxidase (Biolab Diagnóstica SA, Jacarepaguá, RJ, Brasil), diluída a 1:4000. A reação enzimática foi revelada com OPD/H₂O₂ (Sigma Chem. Co., USA) durante 20 minutos ao abrigo da luz, seguida de bloqueio com ácido sulfúrico 4N e a D.O. foi medida em comprimento de onda de 492nm.

A porcentagem de digestão enzimática foi calculada pela razão da D.O. do teste com antígeno tratado dividido pela D.O. do teste com antígeno sem tratamento, subtraída de 100%.

4. AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO E SORO

As amostras de LCR e soro obtidas para o presente estudo foram conservadas a -20°C até o momento de uso.

4.1. GRUPO NEUROCISTICERCOSE

Foram analisadas 29 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de NC, provenientes do Laboratório de Líquor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Neste estudo também foram utilizadas 57 amostras de LCR classificadas conforme exame de imagem e aspectos morfológicos de acordo com MACHADO et al., 1990, sendo que 5 (8,7%) pertenciam ao tipo I (quando não há alterações no exame de imagem); 7 (12,3%) pacientes pertenciam ao tipo II (quando aparecem cistos íntegros, sem sinais de edema ou processo inflamatório); 12 (21,1%) pertenciam ao tipo III (quando

são visualizados cistos associados a processo inflamatório e/ou em degeneração; 13 (22,8%) pertenciam ao tipo IV (quando há apenas calcificações nodulares); 17 (29,8%) pertenciam a formas mistas (nas formas mistas há dois ou mais tipos de imagens); 1 (1,7%) pertencia ao tipo ventricular (associado a qualquer dos tipos descritos); de 2 (3,5%) amostras não foram obtidos dados de imagem. Estas amostras foram previamente ensaiadas com os antígenos salino total de *T. solium* (ST-Tso) e LV-Tcra. No ELISA com o antígeno ST-Tso três das 57 amostras apresentaram resultado negativo para NC e com o antígeno LV-Tcra duas destas três amostras também foram negativas (BUENO, et al., 2000).

Foram analisadas ainda, sete amostras de soro de pacientes com NC.

4.2. GRUPO CONTROLE

Foram analisadas 29 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial negativo para NC, provenientes do Laboratório de Líquor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram analisadas também 3 amostras de soro de indivíduos saudáveis.

4.3. GRUPO DE OUTRAS PATOLOGIAS

Sete amostras de LCR de pacientes com esquistossomose e seis amostras de LCR de pacientes com neurosífilis.

Três amostras de soro de pacientes com hidatidose, também foram ensaiadas.

4.4. LCR CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO PARA NEUROCISTICERCOSE

Em todos os testes realizados foram utilizados como controle “pool” de LCR de pacientes com NC (“pool” LCR positivo) e sem NC (“pool” LCR negativo).

5. TESTES IMUNOLÓGICOS

As técnicas de ELISA e imunoblot foram padronizadas por meio de titulação em bloco de todos os seus componentes: concentração antigênica, tempo de bloqueio, temperatura, diluição de amostras e de conjugado e substrato cromogênico.

5.1. ELISA

5.1.1. ANTÍGENO DE *Taenia solium*

Foi utilizado kit comercial, BioELISA Neurocisti para pesquisa de anticorpos anti-*T. solium* com antígeno de *Taenia solium* (Biolab Diagnóstica SA, Jacarepaguá, RJ, Brasil), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante.

5.1.2. ANTÍGENOS DE *Taenia crassiceps*

A titulação em bloco dos antígenos, do conjugado e determinação de substrato indicou a concentração protéica de antígeno LV-Tcra 2µg/ml, ConA-Tcra 0,43µg/ml e GP-Tcra 20µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (Serva Feinbiochemica GmbH & Co.).

As placas foram bloqueadas durante 30 minutos em solução bloqueadora (leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil)

a 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 (Merck, Schuchardt, Munchen, Alemanha).

Como conjugado foi utilizada imunoglobulina de carneiro anti-IgG humana marcada com peroxidase (Biolab Diagnóstica SA, Jacarepaguá, RJ, Brasil), diluída a 1:10.000 para os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra. Para o ELISA com antígeno GP-Tcra, o conjugado foi diluído a 1:4000. A reação enzimática foi revelada com adição de solução substrato cromógeno tetrametilbenzidina/H₂O₂ (TMB Roche Diagnostics GmbH, Alemanha).

O tempo de bloqueio, incubação de amostra e de conjugado foram padronizados para 30 minutos e o substrato foi incubado durante 15 minutos ao abrigo da luz. A reação enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas em comprimento de onda 450nm.

Foram realizadas lavagens das placas entre as etapas de bloqueio, incubação de amostra e incubação de conjugado, com solução salina contendo 0,05% de Tween 20 (Merck, Schuchardt, Munchen, Alemanha).

As amostras de LCR foram diluídas a 1:2 em solução diluente (leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 1% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 (Merck, Schuchardt, Munchen, Alemanha) e ensaiadas em duplicata, utilizando-se diferentes placas.

Em cada teste foi realizado um “branco” como controle sem amostra, mas com conjugado e substrato para verificar a reatividade de fundo que não podia exceder de 0,100 de densidade óptica.

Todas as etapas (exceto as lavagens) foram realizadas a 37°C.

5.1.3. LIMIAR DE REATIVIDADE (*CUT- OFF*)

Para o cálculo de *cut-off* de ensaio com antígeno de *T. solium* foram seguidas as recomendações do fabricante, em que se utiliza em duplicata o controle positivo de limiar, calculando-se a média dos valores de absorbância e o valor encontrado corresponde ao *cut-off*. Como controle do teste foram utilizados os controles negativo e seu valor não deve ser maior

do que 0,15 ($< 0,15$) e um controle positivo que não deve ser menor do que 0,8 ($> 0,8$). Para determinação da reatividade das amostras ensaiadas, divide-se a D.O. da amostra pela D.O. do *cut-off* e a interpretação dos resultados é realizada, considerando-se os índices $\geq 1,2$ reagente e não reagente quando o índice for $\leq 0,8$ e inconclusiva quando os índices não encontrarem-se entre esses valores.

Para a pesquisa dos anticorpos da classe IgG utilizando-se os extratos antigênicos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra a determinação do *cut-off* foi realizado a partir de análise dos resultados das amostras do Grupo Controle, pela média de D.O. acrescido de três desvios-padrão. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram D.O. igual ou superior ao valor de *cut-off*.

5.1.4. ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE DOS ANTÍGENOS LV-*T. crassiceps* E ConA-*T. crassiceps*

Em cada procedimento de ELISA foram utilizados como controle de reação do teste, o “pool” de LCR positivo diluído a partir de 1:2 até 1:128 e “pool” de LCR negativo diluído a 1:2, ambos em solução diluente. Os testes foram realizados como descritos no item 5.1.2. Os resultados dos vários ensaios com os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra foram analisados para verificação de reprodutibilidade.

5.2. TESTE IMUNOENZIMÁTICO IMUNOBLOT

5.2.1. ANTÍGENO LV-*T. crassiceps*

Após a transferência do antígeno LV-Tcra separado por SDS-PAGE, as membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3mm, lavadas em solução de lavagem e bloqueados os sítios reativos remanescentes durante 2 horas em solução bloqueadora (tampão de bloqueio, diluente de amostra e conjugado: solução de leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo,

Brasil) a 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20, sob agitação constante e a temperatura ambiente.

Para pesquisa de IgG as amostras de LCR foram diluídas a 1:10 em solução diluente e incubadas durante 18 horas a 4°C, sob constante e leve agitação. Como conjugado utilizou-se imunoglobulina de cabra anti-IgG humana marcada com biotina e avidina-peroxidase (Cambridge Biotech Co., MA, EUA), diluída a 1:2000 em solução diluente. O tempo de incubação para cada uma foi de uma hora, intercalada de 3 etapas de lavagens de 10 minutos. A reação foi revelada com solução substrato-cromógeno DAB/H₂O₂, sob agitação constante até o aparecimento das bandas reativas e, então, bloqueada com água destilada.

5.2.2. ANTÍGENO ConA-*T. crassiceps* e GP-*T. crassiceps*

Membranas de nitrocelulose contendo o antígeno ConA-Tcra fracionado por SDS-PAGE foram cortadas em tiras de 3mm e lavadas em tampão de lavagem por 3 vezes durante 5 minutos cada e bloqueadas em solução diluente durante 30 minutos, sob constante agitação a temperatura ambiente. As amostras de LCR foram diluídas a 1:4 em solução diluente e incubadas durante uma hora. Como conjugado utilizou-se imunoglobulina de cabra anti-IgG humana (cadeia γ específica) marcado com fosfatase alcalina (Sigma Chem. Co., USA), diluída a 1:1.500 em solução diluente. As tiras foram rapidamente lavadas com água destilada e então foi adicionado o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato, nitroblue tetrazolium (NBT/BCIP) (Sigma Chem. Co., USA), uma pastilha de 226mg diluída em 10ml de água destilada. O bloqueio da reação enzimática foi realizado com água destilada, e as tiras foram lavadas por mais 10 minutos também em água destilada.

As membranas de PVDF contendo o antígeno GP-Tcra separado por SDS-PAGE foram cortadas em tiras de 3mm, lavadas em solução de lavagem e bloqueados os sítios reativos remanescentes durante 2 horas em solução bloqueadora, sob agitação constante e a temperatura

ambiente. Foram utilizadas as amostras de soro de pacientes com NC, hidatidose e de indivíduos saudáveis diluídas a 1:40, 1:50, 1:50, respectivamente, e amostras de LCR do Grupo NC diluídas a 1:4 em solução diluente. As amostras foram incubadas durante 18 horas a 4°C, sob constante e leve agitação. Como conjugado foi utilizada imunoglobulina de cabra anti-IgG humana marcada com fosfatase alcalina diluída a 1:1500 e incubada durante 2 horas sob constante agitação e a temperatura ambiente. As tiras foram lavadas com água destilada e reveladas com o substrato NBT/BCPI.

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ANTIGÊNICOS

1.1. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração protéica do antígeno LV-Tcra foi de 2,00mg/ml , do antígeno ConA-Tcra foi de 0,43mg/ml e do antígeno GP-Tcra foi de 0,20mg/ml.

1.2. DOSAGEM DE POLISSACARÍDEOS

A dosagem de polissacarídeos foi determinada a partir de curva padrão obtida por regressão linear. Desta forma, os valores de D.O. foram correlacionados com a concentração de polissacarídeos. A concentração de polissacarídeos do antígeno LV-Tcra foi de 0,61mg/ml, no antígeno ConA-Tcra de 12,94mg/ml e no antígeno GP-Tcra de 0,41mg/ml.

1.3. PADRÃO TOTAL DE PEPTÍDEOS POR SDS-PAGE

Na **figura 1** são apresentados os resultados de SDS-PAGE 15% dos extratos antigênicos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra com coloração pelos métodos da prata e Coomassie Blue.

FIGURA 1: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% dos extratos antigênicos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra. **A:** Tiras 1 e 3 Ag LV-Tcra; 2 e 4 Ag ConA-Tcra, 1 e 2 corado pelo Coomassie Blue R-250 e 3 e 4 corados pela prata. **B:** Tiras 1 Ag GP-Tcra corado pela prata e 2 Ag LV-Tcra corado pelo Coomassie Blue R-250. À esquerda e ao meio padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kD).

1.4. BLOT LECTINA

As frações antigênicas LV-Tcra e ConA-Tcra separadas por SDS-PAGE 15% e transferidas eletroforéticamente para membrana de PVDF foram caracterizadas pelo blot lectina frente as lectinas ConA e BS-I marcadas com peroxidase (**figura 2**).

Por meio de blot lectina no antígeno LV-Tcra foram detectados peptídeos contendo D-glicose/manose de 85, 67, e muito fracamente o peptídeo de 12kD (com a lectina ConA) e galactose de 98kD (com a lectina BS-I).

No antígeno ConA-Tcra foram detectados peptídeos contendo D-glicose de 31, 24, 14kD e D-manose de 46, 44, 31, 24, 14kD (com a lectina ConA) e galactose de 98, 94, 85, 67, 31kD (com a lectina BS-I).

A prévia oxidação com periodato de sódio das membranas contendo as frações antigênicas inibiu totalmente a reatividade das lectinas.

FIGURA 2: Blot lectina dos antígenos ConA-Tcra (tiras 1- 4; 9-11) e LV-Tcra (tiras 5-8; 12-14) ensaiados com as Lectinas marcadas Con A-peroxidase (1-8) e BS-I peroxidase (9-14). Ensaio pré-oxidação das tiras (4, 8, 11 e 14) e competitivos com açúcares específicos glicose (2 e 6) e manose (3 e 7) para ConA e galactose (10 e 13) para BS-I.

1.5. TESTE DE OXIDAÇÃO

Pela técnica de ELISA realizou-se teste de pré-oxidação dos antígenos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra com ácido periódico em diferentes concentrações. Os resultados demonstraram que a oxidação foi mais evidente a partir da concentração de 200mM de ácido periódico nos antígenos ConA-Tcra e GP-Tcra comparados ao antígeno LV-Tcra (**figura 3**).

Foram também ensaiadas sete amostras de LCR positivas para NC, em presença dos antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra pré oxidados com 200mM de ácido periódico. A **figura 4** mostra esses resultados, sendo observada a oxidação que os antígenos sofreram pela ação do ácido periódico, pois houve diminuição da reatividade dos antígenos frente as amostras.

No **ANEXO II**, estão apresentados os resultados dos testes de pré-oxidação.

Figura 3: Resultados de ELISA em porcentagem de oxidação (redução de antigenicidade) dos antígenos líquido vesicular de *T. crassiceps*, Concanavalina A de *T. crassiceps* e Glicoprotéico de *T. crassiceps* não tratados (reação controle) e após tratamento com ácido periódico em diferentes concentrações de 10mM, 50mM, 200mM, 1M e 2M ensaiados com uma amostra de soro positivo para NC.

Figura 4: Resultados de ELISA em porcentagem de oxidação (redução de antigenicidade) dos antígenos líquido vesicular de *T. crassiceps* e Concanavalina A de *T. crassiceps* após tratamento com ácido periódico na concentração de 200mM para sete amostras de LCR positivas para NC.

1.6. TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Quando os extratos antigênicos ConA-Tcra, LV-Tcra e GP-Tcra foram tratados com diferentes concentrações (50 e 500µg/ml) das enzimas proteolíticas proteinase K e tripsina observou-se queda na reatividade dos três antígenos no ELISA com soro positivo para NC. Na **figura 5** estão apresentados os resultados do efeito da presença da proteinase K e na **figura 6** o efeito da tripsina. Verificou-se que os antígenos ConA-Tcra e GP-Tcra foram bem mais sensíveis a ambos os tratamentos enzimáticos do que o antígeno LV-Tcra.

No **ANEXO III**, estão apresentados os resultados do ELISA antes do tratamento enzimático (reação controle) e após o tratamento enzimático dos antígenos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra em presença das enzimas proteinase K e tripsina.

Figura 5: Resultados do ELISA em porcentagem de digestão enzimática (redução de antigenicidade) dos antígenos Líquido vesicular de *T. crassiceps*, Concanavalina A de *T. crassiceps* e Glicoprotéico de *T. crassiceps* não tratados (reação controle sem enzima) e tratados com a enzima proteolítica proteinase K nas concentrações de 50 e 500µg/ml ensaiados com uma amostra de soro positivo para NC.

Figura 6: Resultados do ELISA em porcentagem de digestão enzimática (redução de antigenicidade) dos antígenos Líquido vesicular de *T. crassiceps*, Concanavalina A de *T. crassiceps* e Glicoprotéico de *T. crassiceps* não tratados (reação controle sem enzima) e tratados com a enzima proteolítica tripsina nas concentrações de 50 e 500µg/ml ensaiados com uma amostra de soro positivo para NC.

2. TESTES IMUNOLÓGICOS (ELISA E IMUNOBLOT) EMPREGADOS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO NO DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE

2.1. TESTE IMUNOENZIMÁTICO: ELISA

2.1.1. ANTÍGENO DE *Taenia solium*

Vinte e nove amostras do Grupo NC foram ensaiadas para detecção de anticorpos anti-*T. solium* com kit comercial BioELISA Neurocisti.

Quatro dessas 29 amostras de LCR classificadas como positivas para NC apresentaram resultado indeterminado e outras duas apresentaram resultado negativo para a pesquisa de anticorpo anti-*T. solium* e as outras 23 amostras restantes foram reagentes com o antígeno de *T. solium* (ANEXO IV).

Para verificar a reatividade cruzada para o antígeno de *T. solium*, também foram ensaiadas as sete amostras de LCR de esquistossomose e as seis amostras de LCR de neurosífilis.

Todas as sete amostras de esquistossomose apresentaram resultado negativo e das seis amostras de LCR positivas para neurosífilis uma amostra foi reagente, quando ensaiada com o kit BioELISA de *T. solium* (ANEXO VII).

2.1.2. ANTÍGENOS DE *Taenia crassiceps*

O extrato antigênico foi titulado pela técnica de ELISA nas diluições de 1:4, 1:10, 1:50 e 1:100 com “pool” de LCR positivo para NC a partir de 1:2 até 1:128 e “pool” de LCR negativo diluído a 1:2. Os resultados desta titulação encontram-se na **figura 7**.

Figura 7: Resultado de ELISA de titulação do antígeno Glicoprotéico de *T. crassiceps* diluído a 1:4, 1:10, 1:50 e 1:100 com “pool” de LCR positivo para neurocisticercose diluído a partir de 1:2 até 1:128.

A partir dos resultados de ELISA obtidos das amostras do Grupo Controle (**ANEXO V**), foi calculado o *cut-off* para os antígenos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra, em que utilizou-se a média acrescida de 3 desvios padrão das amostras do Grupo Controle, sendo os *cut-off* para o antígeno LV-Tcra = 0,23, ConA-Tcra = 0,22 e GP-Tcra = 0,21.

As 29 amostras do Grupo NC, apresentaram reatividade com o antígeno ConA-Tcra. Com o antígeno LV-Tcra foram ensaiadas 28 amostras e todas foram reativas. Com o antígeno GP-Tcra foram ensaiadas apenas 15 amostras, sendo todas reativas. As amostras que apresentaram resultado negativo (duas) ou indeterminado (quatro) pelo teste BioELISA Neurocisti que utiliza antígeno de *T. solium*, apresentaram resultado reagente com os três antígenos de *T. crassiceps* (**ANEXO IV**).

Foram calculados a média e o desvio padrão dos resultados de D.O. para o grupo de amostras Neurocisticercose para os três antígenos, obtendo-se para o antígeno LV-Tcra (média 2,01 e desvio padrão 1,38), ConA-Tcra (média 1,82 e desvio padrão 1,39) e GP-Tcra (média 0,86 e desvio padrão 0,96).

A **figura 8** mostra os resultados das amostras dos grupos Neurocisticercose e Controle ensaiadas em ELISA com os antígenos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra. Na figura também estão indicados os *cut-off* dos antígenos.

Entre as outras 57 amostras de LCR do Grupo Neurocisticercose de pacientes em diferentes fases evolutivas do parasita, três haviam apresentado resultado negativo ensaiadas com o antígeno ST-Tso e duas dessas três amostras apresentaram resultados negativo quando ensaiadas com LV-Tcra (BUENO et al., 2000). Os resultados do ensaio ELISA com os antígenos ConA-Tcra e GP-Tcra encontram-se no **ANEXO VI**.

Quando ensaiadas em ELISA com o antígeno ConA-Tcra, uma das três amostras apresentou resultado positivo (amostra 62 Tipo I) e as duas outras apresentaram resultado negativo (amostras 51 Tipo III e 58 Tipo IV). Uma outra amostra apresentou resultado negativo (amostra 9 Tipo III).

A média e desvio padrão das 57 amostras ensaiadas com o antígeno ConA-Tcra foram calculadas, conforme classificação de estágio de desenvolvimento do parasita, sendo: Tipo I (média 1,55 e desvio padrão 1,25), Tipo II (média 1,07 e desvio padrão 0,99), Tipo III (média 1,05 e desvio padrão 1,28), Tipo IV (média 1,31 e desvio padrão 1,21), Tipo Misto (média 1,32 e desvio padrão 0,93), duas amostras sem classificação (média 2,27 e desvio padrão 1,87).

A **figura 9** representa o resultado do ELISA das 57 amostras do Grupo NC, classificadas segundo MACHADO et al., 1990, ensaiadas com o antígeno ConA-Tcra.

Somente as três amostras que apresentaram resultado negativo com o antígeno ConA-Tcra também foram ensaiadas com o antígeno GP-Tcra, e apresentaram resultado negativo.

Os resultados do ELISA com as amostras do Grupo Outras Patologias encontram-se no **ANEXO VII**.

Quando as sete amostras de esquistossomose foram ensaiadas com o kit BioELISA Neurocisti, nenhuma amostra apresentou reatividade com o antígeno de *T. solium*.

Estas amostras também foram ensaiadas com os antígenos de *T. crassiceps*. Com os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra, três amostras foram reagentes, com resultados de D.O. para o antígeno LV-Tcra de 0,45; 0,31; 0,28 (*cut-off* de 0,23) e para o antígeno ConA-Tcra com resultados de D.O. de 0,51; 0,50; 0,24 (*cut-off* de 0,22). Duas dessas três amostras de esquistossomose também foram ensaiadas com o antígeno GP-Tcra e as duas foram reagentes com resultados de D.O. de 0,55 e 0,21 (*cut-off* 0,21).

Das seis amostras de neurosífilis, uma foi reagente no teste BioELISA com antígeno de *T. solium*, com índice de 1,7 (*cut-off* $\geq 1,2$).

Quando as seis amostras foram ensaiadas com os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra, duas foram reagentes para o antígeno LV-Tcra com resultados de D.O. de 0,80, 0,35, e com o antígeno ConA-Tcra, três foram reagentes, com resultados de D.O. de 1,56, 0,28, e 0,34. Com o antígeno GP-Tcra foram ensaiadas apenas as três amostras de neurosífilis reagentes com o antígeno ConA-Tcra e uma amostra teve resultado negativo, enquanto que as outras duas foram reagentes com resultados de D.O. de 0,53 e 0,27.

2.1.3. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE ELISA

O índice de sensibilidade foi calculado com os resultados do ELISA das amostras do Grupo Neurocisticercose e o índice de especificidade foi calculado com os resultados das amostras do Grupo Controle.

Os testes com o antígeno LV-Tcra foram realizados com 28 amostras de LCR, e para o antígeno ConA-Tcra foram realizados com 29 amostras de LCR do Grupo NC e para ambos os antígenos com 29 amostras de LCR do Grupo Controle. Para o antígeno GP-Tcra foram ensaiadas 15 amostras de LCR do Grupo NC e dez amostras de LCR do Grupo Controle. A sensibilidade e a especificidade dos ensaios de ELISA para os extratos antigênicos de LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra foram de 100%.

Figura 8: Resultados em densidade óptica de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*T. solium*, das amostras de LCR dos grupos Neurocisticercose e Controle ensaiadas com os extratos antigênicos líquido vesicular de *T. crassiceps*, Concanavalina A de *T. crassiceps* e Glicoprotéico de *T. crassiceps*. Os *cut-off* dos testes estão representados na figura.

Figura 9: Resultados em densidade óptica de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*T. solium*, de 57 amostras do Grupo de LCR em diferentes fases evolutivas da doença classificadas segundo MACHADO et al., 1990, ensaiadas com o extrato antigênico Concanavalina A de *T. crassiceps*.

2.1.4. ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE

Foi realizado ensaio de reprodutibilidade com os extratos antigênicos LV-Tcra e ConA-Tcra, com o “pool” de LCR positivo diluído a partir de 1:2 até 1:1024 e “pool” de LCR negativo diluído 1:2. Foram calculados a média, desvio padrão, coeficiente de variação e “limites de variação”, com os resultados de ELISA em diferentes dias de ensaios. Os resultados dos ensaios com o antígeno LV-Tcra encontram-se na **Tabela 1** e para o

antígeno ConA-Tcra encontram-se na **Tabela 2**. No **ANEXO VIII** estão apresentados os resultados de todos os ensaios para ambos os antígenos.

Tabela 1: Resultados de seis ensaios de ELISA com amostras de LCR “pool” positivo e negativo, valores de média, desvio padrão, coeficiente de variação e limites para o antígeno Líquido vesicular de *T. crassiceps*.

Diluição Pool+	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação	Limite
1:2	3,62	0,17	4,6	3,96 – 3,28
1:4	3,58	0,18	5,02	3,94 – 3,22
1:8	3,47	0,18	5,18	3,83 – 3,11
1:16	3,14	0,19	6,05	3,25 – 2,76
1:32	2,40	0,19	7,91	2,78 – 2,02
1:64	1,72	0,23	13,37	2,18 – 1,26
1:128	0,87	0,12	13,79	1,11 – 0,63
1:256	0,62	0,03	4,83	0,68 – 0,56
1:512	0,30	0,07	23,33	0,44 – 0,16
1:1024	0,21	0,02	9,52	0,25 – 0,17
Pool -				
1:2	0,13	0,02	23,07	0,19 – 0,19

Tabela 2: Resultados de nove ensaios de ELISA com amostras de LCR “pool” positivo e negativo, valores de desvio padrão, coeficiente de variação e limites para o antígeno Concanavalina A de *T. crassiceps*.

Diluição Pool+	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação	Limite
1:2	3,56	0,16	4,5	3,88 – 3,24
1:4	3,35	0,38	11,3	4,71 – 2,59
1:8	2,84	0,45	15,9	3,74 – 1,94
1:16	2,24	0,39	17,4	3,02 – 1,46
1:32	1,44	0,19	13,2	1,82 – 1,06
1:64	0,77	0,13	16,9	1,03 – 0,51
1:128	0,45	0,11	24,5	0,67 – 0,23
1:256	0,32	0,05	15,6	0,42 – 0,22
1:512	0,23	0,06	26,0	0,35 – 0,11
1:1024	0,17	0,05	29,4	0,27 – 0,07
Pool -				
1:2	0,17	0,04	23,5	0,25 – 0,09

2.2. TESTE IMUNOENZIMÁTICO: IMUNOBLLOT

Das 29 amostras de LCR do Grupo NC anteriormente ensaiadas em ELISA com o extrato antigênicos LV-Tcra, 17 foram ensaiadas com o antígeno LV-Tcra em imunoblot, em que foram identificados os peptídeos por ordem de frequência foram: 14-11kD (100%), 62kD (100%), 68kD (100%), 91kD (76%), 25kD (70%), 46kD (64%), 18kD (58%), 43kD (23%), 9-8kD (17%), 56kD (11%) e 32kD (11%). Na **figura 10** estão apresentados os resultados do imunoblot destas 17 amostras de LCR positivas para NC ensaiadas com o antígeno LV-Tcra.

Nove dessas 29 amostras de LCR do Grupo NC foram ensaiadas com o antígeno ConA-Tcra e oito amostras de LCR foram ensaiadas com o antígeno GP-Tcra. Para o antígeno ConA-Tcra, neste teste os peptídeos identificados por ordem de frequência foram: 14kD (100%), 28kD (66%), 18kD (55%), 46kD (44%), 43kD (22%), 94kD (22%), 103kD (22%). Para o antígeno GP-Tcra foram identificados os peptídeos de 18 – 14kD em todas as amostras (frequência de 100%). Na **figura 11** são mostrados os resultados destes ensaios.

Quatro amostras de soro de pacientes com cisticercose, três amostras de soro de pacientes com hidatidose e três amostras de soro de indivíduos saudáveis foram ensaiadas em imunoblot com os antígenos ConA-Tcra e GP-Tcra. Somente as amostras de soro de pacientes com NC apresentaram reatividade com os peptídeos de 18 – 14kD. Na **figura 12** são apresentados os resultados de imunoblot com os antígenos ConA-Tcra e GP-Tcra.

Duas das três amostras de LCR de pacientes com esquistossomose e as três amostras de LCR de pacientes com neurosífilis que tiveram resultado de D.O. reagentes nos ensaios ELISA com os extratos antigênicos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra foram ensaiadas em imunoblot com os respectivos antígenos. As amostras de LCR de esquistossomose não apresentaram reatividade com nenhum dos antígenos e das amostras de LCR de pacientes com neurosífilis, uma amostra foi fortemente reagente com os três antígenos e uma foi reagente com menor intensidade. Na **figura 13** são apresentados esses resultados.

Figura 10: Imunoblot das amostras de LCR do Grupo NC com o extrato antigênico Líquido vesicular de *Taenia crassiceps* separadas em gradiente de gel SDS-PAGE 7-20%. C+: controle positivo, C-: controle negativo, à esquerda padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kD).

Figura 11: Imunoblot de amostras de LCR do Grupo NC, frente ao extrato antigênico Concanavalina A de *Taenia crassiceps* submetido previamente à SDS-PAGE em gel de 20% e Glicoprotéico de *Taenia crassiceps* submetido previamente à SDS-PAGE em gel de 15%. C+: controle positivo e C-: controle negativo, CR (controle da reação) à esquerda padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kD).

Figura 12: Imunoblot das amostras de soro de pacientes positivos para neurocisticercose (A), soros de pacientes com hidatidose (B) e soros de indivíduos saudáveis (C) frente ao extrato antigênico Concanavalina A de *Taenia crassiceps* submetido à SDS-PAGE em gel de 20%; frente ao extrato antigênico Glicoprotéico de *Taenia crassiceps* submetido à SDS-PAGE em gel de 15%. À esquerda padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kD), C+: controle positivo, C-: controle negativo. As setas indicam as bandas de 18kD e 14kD.

Figura 13: Imunoblot das amostras de LCR de pacientes positivos para esquistossomose (A) e neurosífilis (B) frente aos extratos antigênicos Líquido vesicular de *Taenia crassiceps*, Concanavalina A de *Taenia crassiceps* e Glicoprotéico de *Taenia crassiceps* submetidos à SDS-PAGE em gel de 15%. À esquerda e ao centro padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kD), C+: controle positivo, C-: controle negativo.

DISCUSSÃO

A falta de uma política adequada de saneamento básico e de higiene apropriada, torna a cisticercose doença grave que representa sério problema de Saúde Pública principalmente em países em desenvolvimento (DEL BRUTO & SOTELO, 1988; VALDEZ et al., 1994; EVANS-CARLTON et al., 1997; ITO et al., 1998).

O diagnóstico da NC é difícil e muitas vezes inacessível para a maior parte da população, por utilizar os exames de imagem, que apesar de apresentarem alta sensibilidade, são muito caros e muitas vezes restritos a centros especializados (DIAS et al., 1991; VAZ & LIVRAMENTO, 1996). A variedade e inespecificidade dos sintomas apresentados pelo paciente e a gravidade da evolução em certos casos, justifica a necessidade do estabelecimento precoce do diagnóstico de cisticercose (SPINA-FRANÇA, 1956; PAMMENTER et al., 1987; KUNZ et al., 1989). Mesmo com a utilização de drogas no tratamento da cisticercose, a verdadeira solução para o problema consiste no estabelecimento de medidas de prevenção da infecção (TAKAYANAGHI, 1990).

Apesar da importância dos testes imunológicos no diagnóstico da NC, a obtenção de antígenos de *T. solium* a partir de suínos portadores da infecção natural, apresenta várias dificuldades, como a falta de homogeneidade dos lotes empregados, devido a forma de sua preparação envolver grande perda de líquido vesicular, obtendo-se praticamente

antígenos de membrana e de escólex, que apresentam resultados de menor sensibilidade nos testes imunológicos, além dos riscos freqüentes em sua prática, já que os cisticercos são geralmente obtidos de suínos encontrados em abatedouros clandestinos (LARRALDE et al., 1990; GARCIA et al., 1995; ANDRADE et al., 1996; VAZ et al., 1996; VAZ & LIVRAMENTO, 1996; FERREIRA et al., 1997; VAZ et al., 1997; ITO et al., 1998; BUENO et al., 2000).

Mesmo com a dificuldade de obtenção do extrato antigênico de *T. solium*, este tipo de antígeno vem sendo usado em muitos estudos para a detecção de anticorpos anti-*T. solium* em amostras de LCR e de soro no diagnóstico da NC, já que os ensaios imunológicos apresentam vantagens econômicas comparados aos exames de imagem (COSTA et al., 1982; MOHAMMAD et al., 1984; LIVRAMENTO et al., 1985; PIALARISSI et al., 1987; GOTTSTEIN et al., 1987; VAZ & FERREIRA, 1988; BASSI et al., 1991; VAZ, 1993; FLISSER et al., 1997; HUBERT et al., 1999).

Pesquisadores demonstraram também a importância e aplicabilidade de extratos antigênicos purificados, sugerindo principalmente a utilização de frações glicoprotéicas de *T. solium*, mas a dificuldade na obtenção do extrato total para posterior purificação, ainda persiste (GROGL et al., 1985; PARKHOUSE & HARRISON, 1987; TSANG et al., 1989; BAUMEISTER et al., 1992; LANDA et al., 1993; PLANCARTE et al., 1994; RODRIGUEZ-CANUL, et al., 1997; KO et al., 1998; ITO et al., 1998).

Devido aos problemas de obtenção dos extratos antigênicos de *T. solium*, o emprego do antígeno heterólogo de *Taenia crassiceps* para o diagnóstico da cisticercose humana e animal, torna-se uma importante fonte alternativa de antígenos e tem sido descrito como modelo de estudo da cisticercose, auxiliando também no esclarecimento da complexa relação parasita-hospedeiro, além da vantagem econômica e facilidade de obtenção dos cisticercos (CÁRDENAS et al., 1989; KUNZ et al., 1989; LARRALDE et al., 1990; KALLINA et al., 1990; VAZ et al., 1993; VAZ et al., 1996; GARCIA et al., 1995; VAZ et al., 1997; FERREIRA et al., 1997; FLISSER et al., 1997; PINTO, 1998; PARDINI et al., 1999).

Considerando a importância de obtenção de antígenos específicos para o emprego em testes imunológicos, nosso objetivo foi o estudo de frações antigênicas glicoprotéicas purificadas de cisticercos de *T. crassiceps*, que foram analisadas quanto à detecção de anticorpos anti-*T. solium* em amostras de LCR e de soro de pacientes com NC.

ESPINOZA & FLISSER, 1986, ressaltaram a importância da identificação e caracterização de antígenos específicos e de reatividade cruzada entre os cisticercos de *T. saginata*, *T. solium*, *T. hydatigena*, *Fasciola hepatica*, *Ascaris lumbricoides* e *Parascaris equorum*, sugerindo que a reatividade cruzada existente entre os parasitas, pode ser útil na produção de extratos antigênicos com aplicação em imunodiagnóstico a partir de outro parasita que contenha antígenos de reatividade cruzada, e do emprego do antígeno de reatividade cruzada para vacinação simultânea para vários parasitas.

A substituição do antígeno de *T. solium* pelo de *T. crassiceps* já foi avaliada por LARRALDE et al., 1990, mostrando que o antígeno de *T. crassiceps* foi mais sensível e específico na detecção de anticorpos em amostras de LCR, além da sua significativa reprodutibilidade.

A aplicação do LV-Tcra também foi avaliada por meio de Dot-ELISA utilizando suporte de poliéster. A técnica mostrou 100% de especificidade em amostras de LCR de pacientes com NC (VAZ et al., 1996).

VAZ et al., 1997, analisaram a possível utilização do antígeno líquido vesicular de *T. crassiceps* para o diagnóstico da NC por imunoblot em amostras de LCR. Os resultados indicaram que o parasita possui epítomos em comum com cisticercos de *T. solium* em quantidade suficiente para serem utilizados em testes imunológicos.

Assim, para a caracterização dos antígenos de *T. crassiceps*, LV-Tcra, e das frações purificadas ConA-Tcra e GP-Tcra, foram realizados os ensaios de oxidação, tratamentos enzimáticos, dosagens de proteínas e polissacarídeos.

Aos extratos antigênicos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra, foram adicionados inibidores de proteases (PMSF e iodacetamida), pois os

parasitas secretam substâncias com atividades líticas (SIEBERT et al., 1979), que degradam o antígeno. Portanto, a utilização de inibidores de proteases é importante para a preservação dos extratos. Os antígenos LV-Tcra e Total de *T. crassiceps* foram submetidos a tratamento por ultra-som, o que permite melhor homogeneidade dos componentes antigênicos (CEPANZO, 1989).

Os extratos antigênicos de *T. crassiceps* foram submetidos às condições redutoras em SDS-PAGE a 15%. O padrão de peptídeos para o extrato antigênico LV-Tcra foi melhor caracterizado quando o gel foi corado pelo método da prata em que foram identificados 12 peptídeos de peso molecular de 101kD a 19 – 7kD, enquanto que corado pelo Coomassie, foram identificadas um menor número de frações (7) de peso molecular de 96kD a 19 - 7kD. Esta diferença deve-se a baixa sensibilidade do corante empregado. No antígeno ConA-Tcra foram identificados 12 peptídeos de peso molecular de 92kD e 14 – 10kD, corados pelo Coomassie e pela prata. Observou-se que nos extratos LV-Tcra e ConA-Tcra, pelas duas técnicas de coloração empregadas, foram identificadas frações de peso molecular acima de 40kD, devido a composição mais complexa dos antígenos. Para o extrato GP-Tcra, foram identificados somente os peptídeos de 18 - 14kD, corados pela prata, devido a seu conteúdo mais purificado (**figura 1**). Os extratos antigênicos LV-Tcra e ConA-Tcra apresentaram um padrão mais heterogêneo de peptídeos, com principal identificação das frações de ≤ 20 kD por uma “grande mancha”, devido a grande concentração de peptídeos com peso molecular inferior a 20kD.

KUNZ et al., 1989, comparando os extratos de líquido vesicular de *T. crassiceps* com o extrato total de *T. solium*, utilizando amostras de soro de pacientes com cisticercose e soro imune de coelhos, demonstraram grande homologia entre as espécies. Com a técnica de marcação com 125 Iodo, foi revelado no líquido vesicular de *T. crassiceps* um total de nove peptídeos com peso molecular de 205kD a 19kD, com o reconhecimento principalmente dos peptídeos de 22kD, 25kD, 32kD e 45kD, detectados por todas as amostras.

Os pesquisadores LANSAM e McMANUS, 1990, descreveram um padrão de peptídeos variando entre 14 e >116kD com predominância das frações de 14kD, 27kD, 55kD e 68kD, nas cepas KBS e Tol de cisticercos de *T. crassiceps*.

Considerando o rendimento dos antígenos, verificou-se que antígeno LV-Tcra contém 2,00mg/ml e 0,61mg/ml, o antígeno ConA-Tcra contém 0,43mg/ml e 12,94mg/ml e o antígeno GP-Tcra contém 0,20mg/ml e 0,41mg/ml, de proteína e polissacarídeos, respectivamente.

Nos ensaios ELISA realizados, os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra foram diluídos a 1:1.000, 2µg/ml e 0,43µg/ml, respectivamente. A partir da titulação do antígeno GP-Tcra, com “pool” de LCR positivo e negativo, determinou-se que este deveria ser empregado na diluição de 1:10 para alcançar a mesma intensidade de reatividade dos outros antígenos (figura 7).

A partir das diluições utilizadas, a concentração de proteínas foi 4,6 vezes maior no antígeno LV-Tcra comparado ao ConA-Tcra, e a concentração de polissacarídeos no antígeno ConA-Tcra foi 21 vezes maior comparada ao LV-Tcra. A concentração de proteína foi 10 vezes maior e de polissacarídeos foi 67 vezes maior no antígeno GP-Tcra em relação ao LV-Tcra e 46 vezes maior foi a concentração de proteína e 3 vezes maior a concentração de polissacarídeos em relação ao antígeno ConA-Tcra. Esta análise confirma que as preparações antigênicas ConA-Tcra e GP-Tcra foram enriquecidas com os componentes glicoprotéicos.

A importância de caracterização das glicoproteínas também em cisticercos de *T. crassiceps*, foi descrita pelos pesquisadores TRIMBLE & LUMSDEN, 1975; SIEBERT et al., 1978, SIEBERT et al., 1979, que analisaram os cisticercos quanto a composição citoquímica. Foram identificados, no tegumento, porções ricas em carboidratos neutros e ácidos. A análise de autoradiografias mostraram presença de resíduos de galactose, e foi caracterizado o glicocalix, que pode influenciar na interação do parasita com o hospedeiro, demonstrando a importância das glicoproteínas.

Os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra, foram caracterizados quanto ao

padrão de glicopeptídeos pela técnica de blot com as lectinas ConA e BS-I marcadas com peroxidase. No antígeno LV-Tcra em presença da lectina ConA foram identificados os peptídeos de 85kD e 67kD e muito fracamente o peptídeo de 12kD contendo resíduos de D-glicose/manose; com a lectina BS-I foi identificado o peptídeo de 98kD contendo resíduo de galactose.

Para o antígeno ConA-Tcra na presença da lectina ConA foram identificados resíduos de D-glicose de 31kD, 24kD e 14kD e D-manose de 46kD, 44kD, 31kD, 24kD e 14kD; e resíduos de galactose de 98kD, 94kD, 85kD, 67kD e 31kD com a lectina BS-I. O teste indicou, que o antígeno purificado ConA-Tcra comparado ao LV-Tcra, apresenta maior número de peptídeos contendo glicose/manose (**Figura 2**); já os resíduos contendo galactose tiveram fraca reação nos dois antígenos. Nos peptídeos de baixo peso molecular (18 –14kD), foram identificados apenas resíduos de glicose/manose.

Com o objetivo de demonstrar a especificidade da ligação com as lectinas, foi realizado a inibição das mesmas, mediante ao ensaio de pré-oxidação com ácido periódico. Os resultados demonstraram que a oxidação inibiu totalmente a ligação das lectinas aos antígenos e inibiu parcialmente também a ligação de anticorpos, quando foram ensaiadas por ELISA, amostras de LCR de pacientes com NC, diminuindo mas não totalmente, a interação antígeno-anticorpo, já que os anticorpos continuaram reconhecendo a porção protéica dos antígenos (**Figura 4**).

GROGL et al. 1985, utilizando antígeno de *T. solium*, identificaram que 65% do extrato antigênico era composto de glicoproteínas, contendo N-acetil-D-glicosamina e α -D-glicose, e ainda ressaltaram o envolvimento das glicoproteínas na antigenicidade do parasita.

Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados pelos pesquisadores LANSAM e McMANUS, 1990, que empregando as técnicas de marcação com 125 Iodo, imunoprecipitação e SDS-PAGE, em estudo das frações protéicas e glicoprotéicas presentes na membrana e no líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps*, observaram peptídeos de peso molecular de 14 a >97kD no extrato de membrana com predomínio dos peptídeos de 37kD, 85kD e 97kD, enquanto que no líquido vesicular

identificaram peptídeos de 14 a >116kD, com predomínio dos peptídeos de 14kD, 27kD, 55kD e 68kD. Em ambos os extratos, foram identificadas glicoproteínas de peso molecular variando de 45kD a 94kD. Somente no extrato de membrana, foi identificada uma glicoproteína de 37kD, contendo resíduos de D-manose e/ou D-glicose, e não observaram presença de resíduos de D-galactose. Ao contrário, KUNZ et al., 1991, em estudo de frações glicolípídicas de *T. crassiceps* cepa KBS, identificaram resíduos de galactose.

Em análise das frações glicolípídicas de cisticercos de *T. solium*, *T. crassiceps* e *T. saginata* BAUMEISTER et al., 1992, com a técnica de HPTLC (high-performance thin-layer chromatography) também identificaram resíduos de galactose e, verificaram que as frações glicolípídicas conferem maior estabilidade estrutural e termodinâmica à membrana parasitária.

Na caracterização de glicoproteínas, resultados negativos no blot lectina devem ser interpretados cuidadosamente, pois apesar de os carboidratos estarem presentes nos cisticercos, poderão tornar-se inacessíveis às lectinas com a transferência dos antígenos para a membrana de nitrocelulose (GROGL et al., 1989).

Com o ensaio de pré-oxidação dos extratos antigênicos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra, pode-se verificar o efeito de oxidação sobre os epítomos constituídos por polissacarídeos.

Os resultados demonstraram que o efeito da oxidação reduziu a atividade antigênica, verificada pelo ensaio ELISA, que aparentemente foi maior no antígeno GP-Tcra seguido de ConA-Tcra e LV-Tcra, mas sem significado devido a proximidade dos valores, 22%, 19% e 18%, respectivamente, com ácido periódico a 200mM (**figura 3/ANEXO II**).

Com as amostras de LCR de pacientes com cisticercose, a maior sensibilidade do antígeno ConA-Tcra ao tratamento oxidativo em relação ao antígeno LV-Tcra foi observada em quatro das sete amostras ensaiadas e em duas amostras o efeito foi semelhante, e apenas em uma amostra, o efeito da oxidação foi maior no antígeno LV-Tcra. A diferença de reatividade que ocorreu entre as amostras, de 74% a 25%, era, devido a

heterogeneidade da resposta imunológica de cada indivíduo esperada (FLISSER et al., 1980) (**figura 4/ANEXO II**). Essa heterogeneidade se observa tanto em relação aos peptídeos reconhecidos (BUENO et al., 2000) quanto à intensidade de reatividade.

Os extratos de *T. crassiceps* foram submetidos a tratamentos enzimáticos, na presença das enzimas proteolíticas proteinase K e tripsina, em que verificou-se a ação enzimática em relação à perda de reatividade e antigenicidade dos epítomos constituídos por proteínas. Os resultados demonstraram que o efeito dos tratamentos enzimáticos foi mais significativo do que o efeito oxidativo sobre os epítomos constituídos por açúcares. Esse efeito foi ligeiramente menor no antígeno LV-Tcra, comparado aos extratos purificados que apresentaram resultados semelhantes. As diferenças do efeito enzimático devem-se possivelmente a concentração de proteínas, que é menor nos extratos purificados (**figuras 5 e 6/ANEXO III**).

Os estudos de caracterização dos extratos antigênicos aqui apresentados, são uma abordagem inicial para melhor identificação dos componentes responsáveis pela reatividade específica dos antígenos de *T. crassiceps* com os anticorpos anti-*T. solium* em pacientes humanos com NC. Os resultados podem contribuir para futuras investigações e abordagens visando, por exemplo, antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos.

Nos ensaios de reprodutibilidade do teste imunoenzimático ELISA com os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra realizado com o mesmo “pool” de LCR positivo e negativo, em diferentes dias, observou-se boa reprodutibilidade nos testes (**Tabelas 1 e 2**). Os limites de variação inferior e superior das leituras de absorbância para cada diluição foram calculados, e não foram detectadas diferenças significativas entre os resultados obtidos para cada diluição nos diferentes dias de ensaio. Estes resultados foram utilizados para validação dos testes posteriores. A média do coeficiente de variação para o antígeno LV-Tcra foi de 9,4% e para ConA-Tcra de 17,5% (**ANEXO VIII**). Esses resultados podem ser considerados como esperados para o teste ELISA e a variação ligeiramente maior no antígeno ConA-Tcra

pode dever-se a diferença na adsorção antigênica as placas de poliestireno, talvez pelo maior conteúdo de resíduos sacarídicos.

Pela análise dos resultados obtidos dos ensaios ELISA, observou-se que a intensidade de reatividade foi sempre maior para o Grupo Neurocisticercose comparado aos grupos Controle e de Outras Patologias, conforme indicados nas **figuras 8 e 9** e nos **ANEXOS IV, V e VII**.

Com os resultados das amostras ensaiadas do Grupo Controle, foram calculados os *cut-off* dos antígenos de *T. crassiceps* conforme indicado na **figura 8**, em que notou-se distinção entre os grupos Controle e Neurocisticercose, além de diferente intensidade de leitura entre as amostras de pacientes com NC, demonstrando mais uma vez, a heterogeneidade da resposta imunológica individual de cada paciente.

No ensaio ELISA das amostras de LCR do Grupo Neurocisticercose, o antígeno de *T. solium* demonstrou menor sensibilidade (79,3%) para pesquisa de anticorpos anti-*T. solium* comparado aos extratos heterólogos, já que das 29 amostras ensaiadas, duas apresentaram resultado negativo e quatro apresentaram resultado inconclusivo e quando foram ensaiadas com os antígenos de *T. crassiceps*, todas as 29 amostras foram reagentes (**ANEXO IV**). Portanto, a sensibilidade e a especificidade do ensaio ELISA para os antígenos heterólogos foram de 100%.

As amostras que tiveram resultado negativo com o antígeno de *T. solium*, apresentaram índice de 0,6. Com o antígeno LV-Tcra apresentaram resultados de D.O. de 0,4 e 1,09, com ConA-Tcra apresentaram resultados de D.O. de 0,33 e 0,69 e com GP-Tcra apenas uma amostra foi ensaiada, com resultado de D.O. 0,30, portanto os casos negativos no ensaio com o antígeno de *T. solium*, foram reagentes com os antígenos de *T. crassiceps*. As amostras que tiveram índice indeterminado com o antígeno de *T. solium*, apresentaram resultados de D.O. para LV-Tcra superior a 0,30, com o ConA-Tcra superior a 0,4 e com GP-Tcra superior a 0,22.

A maior sensibilidade dos extratos heterólogos pode ser explicada pelo emprego de diferentes preparações antigênicas, já que o antígeno de *T. solium* é o extrato total, apresentando menor número de peptídeos de baixo

peso molecular, principalmente inferior a 20kD, enquanto que nos extratos de líquido vesicular de *T. crassiceps*, esses peptídeos são os principais constituintes. Os resultados também demonstraram que mesmo em baixas concentrações de anticorpos, estes foram identificados pelos antígenos de *T. crassiceps*, além de sugerirem que os anticorpos produzidos, provavelmente, foram para os peptídeos de peso molecular inferior a 20kD.

A intensidade de leitura foi semelhante entre os extratos LV-Tcra e ConA-Tcra e, curiosamente quando as amostras foram ensaiadas com o antígeno GP-Tcra, apresentaram leituras mais baixas. É importante ressaltar que os ensaios realizados com os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra, foram realizados em paralelo, enquanto que os ensaios com o antígeno GP-Tcra foram realizados em outro momento e também quando as amostras já haviam sofrido descongelamentos, diminuindo portanto, a possibilidade de encontrarmos a mesma reatividade. Outra hipótese que merece ser verificada, é a possível dificuldade de adsorção das frações glicoprotéicas de 18kD e 14kD do antígeno GP-Tcra.

Uma amostra com resultado falsamente negativo, em um teste imunológico, não significa necessariamente falta de sensibilidade do teste empregado, mas pode significar menor intensidade da resposta humoral do hospedeiro contra o parasita ou presença de antígenos do parasita imunocomplexados aos anticorpos. Outros fatores podem estar envolvidos na não detecção de anticorpos, tais como, diferentes graus de evolução da doença, variação antigênica do parasita e efeitos imunossupressores do tratamento anti-inflamatório (FLISSER et al., 1979).

Alguns autores utilizando extratos glicoprotéicos de *T. solium* obtiveram resultados semelhantes de sensibilidade e especificidade, aos aqui apresentados. GOTTSTEIN et al., 1987, encontraram 100% de especificidade com frações de baixo peso molecular de 26kD e 8kD, reconhecidas somente pelas amostras de soro de pacientes com cisticercose. TSANG et al., 1989, empregando as glicoproteínas (50kD, 42-39kD, 24kD, 21kD, 18kD, 14kD e 13kD), em imunoblot, obtiveram sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. MONTENEGRO et al., 1994, também relataram especificidade de 100% com mesmo extrato

glicoprotéico em imunoblot. KAUR et al., 1996, observaram menor sensibilidade (95,23%) mas 100% de especificidade de peptídeos com peso molecular de 18kD, 20kD e 24kD. Comparando-se os extratos antigênicos total e glicoprotéico de *T. solium*, RODRIGUEZ-CANUL et al., 1997, relataram sensibilidade de 91% e 100%, respectivamente. Em amostras de soro de suínos infectados foi obtida sensibilidade de 93% e especificidade de 100% (RODRIGUEZ-CANUL et al., 1998).

Utilizando o extrato heterólogo líquido vesicular de *T. crassiceps*, VAZ et al., 1996, obtiveram 100% de especificidade. Na cisticercose suína, PINTO, 1998, obteve sensibilidade de 76,9% e especificidade de 97% em ELISA e em imunoblot a sensibilidade foi de 100% e especificidade de 96,7%, com antígenos de cisticercos de *T. crassiceps*.

Pelo imunoblot, o extrato antigênico LV-Tcra apresentou complexa composição antigênica, com peptídeos de peso molecular de 91kD a 14 - 11kD. Essa complexa antigenicidade juntamente com a heterogeneidade da resposta imune, dificultaram a interpretação dos resultados, conforme observado na **figura 10**. O padrão de peptídeos encontrado no extrato antigênico ConA-Tcra, variou entre 103kD e 14kD, semelhantes ao do LV-Tcra, conforme indicado na **figura 11**. Quando as amostras foram ensaiadas com o antígeno GP-Tcra, foram identificados somente os peptídeos de 18 e 14kD, apresentando maior facilidade de leitura para análise dos resultados, comparado aos extratos LV-Tcra e ConA-Tcra.

Outros peptídeos de baixo peso molecular foram descritos como específicos para a detecção da cisticercose a partir de diferentes espécies de *Taenias* e diferentes extratos antigênicos. HAYUNGA et al., 1991, isolaram um peptídeo de <12kD, obtido de líquido vesicular de *T. hydatigena* utilizado na identificação de anticorpos anti-*T. solium* e anti-*T. saginata*. Este peptídeo não apresentou reatividade cruzada com amostras de soro de outras parasitoses e estava presente também no líquido vesicular de *T. crassiceps* e *T. taeniaeformis*.

EV et al., 1999, com proteínas purificadas de escólex *T. solium*, obtiveram três frações de pesos moleculares de 13kD, 17kD e 26kD, no imunoblot. Em ELISA, com amostras de soro, mostraram sensibilidade de

53%, 88% e 100%, e a especificidade de 80%, 100% e 100%, respectivamente. Os autores sugerem que a proteína de 26kD é mais sensível e específica para detecção de anticorpos em amostras de soro de pacientes com cisticercose por ELISA.

Cinquenta e sete amostras de LCR de pacientes em diferentes fases evolutivas do parasita, classificadas segundo MACHADO et al., 1990, também foram ensaiadas com o antígeno ConA-Tcra, por ELISA (**Figura 9**). Três apresentaram resultado negativo com o antígeno salino total de *T. solium* e duas dessas foram também não reagentes com o antígeno LV-Tcra. Com o antígeno ConA-Tcra, uma dessas três amostras foi positiva e as outras duas continuaram apresentando resultado negativo e uma terceira amostra também apresentou resultado negativo. Esta amostra tinha apresentado resultado de D.O. de 0,147 no ELISA LV-Tcra (*cut-off* 0,011) (BUENO et al., 2000). Somente as três amostras com resultado negativo com o antígeno ConA-Tcra, foram ensaiadas com o antígeno GP-Tcra e também apresentaram resultado negativo, com resultados de D.O. muito semelhantes entre si e entre os antígenos, de 0,18, 0,15 e 0,20 para ConA-Tcra (*cut-off* 0,22) e de 0,18, 0,18 e 0,20 (*cut-off* 0,21), além de serem próximos aos respectivos *cut-off*.

Duas das três amostras com resultado negativo para a pesquisa de anticorpo com os antígenos ConA-Tcra e GP-Tcra, foram classificadas pelo exame de imagem como do Tipo III e a terceira foi classificada como do Tipo IV. A não detecção de anticorpos para essas amostras, pode ser explicada pela fase de classificação de desenvolvimento do parasita, já que nas imagens do Tipo III são visualizados cistos associados a processo inflamatório e/ou em degeneração, mas os anticorpos produzidos podem estar complexados com os antígenos, formando os imunocomplexos, impossibilitando portanto, a detecção de anticorpos. Já na amostra classificada como Tipo IV, em que são encontradas apenas calcificações nodulares, a detecção de anticorpos é menos provável.

Alguns autores sugeriram que a detecção de anticorpos para peptídeos de baixo peso molecular possam estar associados à fase

evolutiva do parasita. MICHAULT et al., 1990, com o extrato antigênico de *T. solium*, por imunoblot, identificaram oito frações com peso molecular <36kD, identificadas em 71 amostras de soro de pacientes com cisticercose em diferentes estágios da doença (ativa, calcificação em progressão e inativa). Os pacientes que se encontravam na fase ativa da doença reconheceram principalmente o peptídeo de 14kD.

Igualmente, SIMAC et al., 1995, caracterizaram as frações de 13kD e 14kD encontradas em extrato total de *T. solium* como potenciais marcadores para o diagnóstico da NC, associado ao reconhecimento em amostras de LCR e soro de pacientes com cisticercose, em que foram identificadas vesículas na tomografia computadorizada, não sendo identificados por amostras de pacientes com cistos na fase de calcificação.

YANG et al., 1998, analisaram uma proteína de 10kD (sub unidade da proteína de 150kD) de líquido vesicular de *T. solium*, com as técnicas de imunoblot e imunoprecipitação. A proteína reagiu fortemente com amostras de pacientes com cisticercose (209/217=84,6%) e fracamente com amostras de outras parasitoses.

CHUNG et al., 1999, utilizando um peptídeo recombinante de 10kD de *T. solium*, obtiveram 98% de especificidade e sugeriram a utilização deste peptídeo na diferenciação de pacientes em fase ativa da doença.

Por outro lado, nossos resultados demonstraram que somente em dois pacientes classificados como do tipo III e outro classificado como do tipo IV foram detectados anticorpos, com leitura próxima ao *cut-off*. Nos demais pacientes classificados segundo exame de imagem como, tipo I (5 amostras), tipo II (7 amostras), tipo III (10 amostras), tipo IV (12 amostras), formas mistas (17 amostras), tipo ventricular (1 amostra) e duas amostras sem resultado de imagem, houve detecção de anticorpos empregando-se o extrato glicoprotéico ConA-Tcra, ou seja, não associada ao estágio de desenvolvimento do parasita.

Das amostras do Grupo de Outras Patologias, foi detectada reatividade cruzada em ELISA, com o antígeno de *T. solium* com uma amostra de neurosífilis das seis ensaiadas (**ANEXO VII**). Quando as seis

amostras de neurosífilis foram ensaiadas com os antígenos de *T. crassiceps*, duas apresentaram reatividade para LV-Tcra e GP-Tcra e três foram reagentes para ConA-Tcra. Em imunoblot das três amostras reagentes, aquela que apresentou reatividade com todos os antígenos, apresentou forte reatividade com os peptídeos de baixo peso molecular com os antígenos de *T. crassiceps*, sugerindo produção de anticorpos para peptídeos de baixo peso molecular (**figura 13**).

As amostras de neurosífilis foram retiradas de nossa coleção de LCR e não haviam sido anteriormente ensaiadas para pesquisa de anticorpos anti-*T. solium*. A amostra de neurosífilis que apresentou reatividade com os antígenos de *T. solium* e de *T. crassiceps*, parece ser um caso de cisticercose. A reatividade encontrada em amostras de LCR de pacientes com neurosífilis, pode ser explicado pela dificuldade no diagnóstico diferencial entre a NC e a neurosífilis (LIVRAMENTO, 1981), já que o *Treponema pallidum* pode ocasionar lesões do SNC, observadas principalmente na neurosífilis tardia (CAMARGO, 1996). Novos ensaios em uma amostragem maior poderá estabelecer se há reatividade cruzada, não esperada entre estas patologias

Nenhuma das sete amostras de esquistossomose apresentou reatividade com o antígeno de *T. solium*, enquanto que quando ensaiadas com os extratos de *T. crassiceps*, três amostras apresentaram reatividade, com resultados de D.O. quase duas vezes superior ao *cut-off* dos antígenos. Duas destas três amostras foram ensaiadas em imunoblot e não apresentaram nenhuma reatividade com os antígenos de *T. crassiceps*. A reatividade com os extratos antigênicos de *T. crassiceps* e não reatividade com o antígeno homólogo, deve-se possivelmente pela diferente forma de apresentação do antígeno nos testes empregados, em que o imunoblot mostrou-se mais específico, já que não houve reatividade com nenhum peptídeo.

LACLETTE et al., 1991, com a purificação do antígeno B, uma glicoproteína de *T. solium*, comparando-o ao antígeno de *Schistosoma mansoni*, uma proteína de 97kD, mostrou reatividade também com amostras de cisticercose, sugerindo grande homologia encontrada entre as espécies.

A reatividade cruzada encontrada entre amostras de outras parasitoses, já foi descrita por PAMMENTER et al., 1992, que utilizando ELISA com antígeno solúvel de ovo (SEA), para o imunodiagnóstico da neuroesquistossomose, relataram a reatividade cruzada com amostras de LCR de pacientes com cisticercose.

ITO, 1997, descreveu a importância de diferenciação entre pacientes portadores de cisticercose e hidatidose, sugerindo que o diagnóstico da hidatidose seja realizado utilizando-se uma proteína recombinante de 18,5kD, denominada Em18, que não apresentou reatividade com amostras de outras parasitoses, incluindo a cisticercose.

SCHANTZ et al., 1980, empregando a técnica de hemaglutinação indireta, e PAMMENTER & ROSSOUW, 1987, utilizando extrato de *T. solium*, em ELISA, relataram reatividade cruzada com amostras de soro de pacientes com hidatidose. Nossos resultados não mostraram essa reatividade, quando foram ensaiadas três amostras de soro de pacientes com hidatidose, quatro amostras de soro de indivíduos saudáveis e seis amostras de soro de pacientes com NC, em imunoblot, com os extratos antigênicos ConA-Tcra e GP-Tcra, somente nas amostras de soro de pacientes com NC foram identificados os peptídeos de 14 – 18kD, enquanto que nas amostras de hidatidose e de indivíduos saudáveis, nenhum peptídeo foi detectado (**figura 12**), demonstrando maior especificidade dos peptídeos de baixo peso molecular ≤ 20 kD.

Apesar dos estudos realizados envolvendo o imunodiagnóstico da cisticercose utilizando peptídeos de baixo peso molecular, alguns autores relataram a importância de peptídeos de alto peso molecular, encontrados em extratos de *T. solium*, e que também foram identificados nos extratos LV-Tcra e ConA-Tcra.

GROGL et al., 1985, relataram o reconhecimento de 12 peptídeos no extrato total de *T. solium* variando entre 200kD a 31kD, e os peptídeos de 31kD, 45kD, 95kD e 200kD demonstraram grande similaridade com os mesmos peptídeos encontrados no extrato líquido vesicular de *T. crassiceps*.

LARRALDE et al., 1986, utilizando antígeno líquido vesicular de *T.*

solium, descreveram um peptídeo de 103kD, que apresentou grande homologia com o peptídeo de 102kD presente no extrato líquido vesicular de *T. crassiceps*. A diferença de identificação de peptídeos pode estar relacionada a diferentes metodologias aplicadas (obtenção de antígenos, transferência, reagentes, etc).

KUNZ et al., 1989, comparando os extratos antigênicos líquido vesicular de *T. crassiceps* e total de *T. solium*, identificaram os peptídeos de peso molecular de 102kD e 199kD em 12 amostras de soro de pacientes com cisticercose, além do reconhecimento do peptídeo de 19kD por 11 amostras.

Uma proteína de 97kD do cisticerco de *T. solium* também foi avaliada com 137 amostras de soro de suínos com cisticercose. Nestas amostras, o primeiro antígeno reconhecido pelo isotipo IgM foi a glicoproteína de 97kD e posteriormente o isotipo IgG reconheceu as proteínas de 50kD e 45kD. O teste demonstrou 100% de especificidade e sensibilidade (TSANG et al., 1991).

CHENG & KO, 1992, utilizando coluna Sephacryl S-200, obtiveram quatro frações de extrato de *T. solium*, que foram analisadas por imunodifusão dupla, imonoblot e ELISA. A fração W2 apresentou 20 peptídeos de peso molecular variando de 35 a 180kD. O antígeno W2 mostrou-se mais promissor ao diagnóstico da cisticercose, principalmente para as frações de alto peso molecular de 95kD e 105kD.

Nossos resultados demonstraram que o peptídeo de 102kD foi identificado no extrato ConA-Tcra, sendo reconhecido em 22% das amostras analisadas (**figura 11**); e os peptídeos de 91kD presente no extrato LV-Tcra e 94kD presente no extrato ConA, foram reconhecidos em 76% e 22% das amostras analisadas, respectivamente, enquanto que os peptídeos de baixo peso molecular (≤ 20 kD) foram reconhecidos por todas as amostras.

A reatividade encontrada nos extratos antigênicos de *T. crassiceps* por imunoblot para peptídeos de baixo peso molecular (≤ 20 kD), também foram observadas no extrato antigênico de *T. solium* (TSANG et al., 1989).

Estudos posteriores devem ser realizados para avaliação do emprego

de glicoproteínas de *Taenia crassiceps* em testes imunológicos para pesquisa de anticorpo anti-*T. solium*, principalmente em amostras de soro de pacientes com cisticercose. Permanecendo, portanto, como área de investigação e de interesse no estudo da cisticercose, a padronização de testes (ELISA e imunoblot), além do desenvolvimento de um teste diagnóstico de rápida e fácil execução, empregando-se os glico-antígenos purificados de *Taenia crassiceps* para detecção de anticorpos em diferentes espécimes, LCR, soro, plasma, eluatos de sangue total e saliva.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos na avaliação de extratos antigênicos de *Taenia crassiceps* para detecção de anticorpos em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose, utilizando os ensaios ELISA e imunoblot, pudemos concluir que:

1. Os extratos antigênicos de cisticercos de *T. crassiceps* constituem uma importante fonte alternativa de antígenos para serem utilizados em testes imunológicos;
2. A utilização do antígeno LV-Tcra e das frações purificadas, ConA-Tcra e GP-Tcra, em ELISA mostraram sensibilidade e especificidade de 100% com amostras de LCR;
3. Nos ensaios imunoblot, os peptídeos com peso molecular inferior a 20kD foram identificados pelas amostras de LCR e soro de pacientes com neurocisticercose;

REFERÊNCIAS

- AGAPEJEV, S. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, São Paulo, v.38, n.3, p.207-216, 1996.
- ALBUQUERQUE, E. S., GALHARDO, I. Neurocisticercose no Estado do Rio Grande do Norte. Arq. Neuropsiquiat, São Paulo, v.53, n.3-A, p.464-470, 1995.
- ANDRADE, A. P. F., VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., PALOU, V. S. E. B., CUNHA, R. A. F., FERREIRA, A. W. Immunoperoxidase for the detection of antibodies in cerebrospinal fluid in neurocysticercosis: use of *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus longicollis* particles fixed on microscopy slides. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, São Paulo, v.38, n.4, p.259-263, 1996.
- BASSI, G. E., ISHIKI, D. K., FERREIRA, A. W., CAMARGO, E. M. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano – considerações sobre o limiar de reatividade. Rev. Bras. Pat. Clín., Rio de Janeiro, v.27, n.2, p.49-52, 1991.

De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

- BAUMEISTER, S., DENNIS, R. D., KUNZ, J., WIEGANDT, H., GEYER, E. Comparative serological reactivity of *Taenia crassiceps*, *Taenia solium* and *Taenia saginata* metacestode neutral glycolipids to infection serum from *Taenia crassiceps* - infected mice. Mol. Biochem. Parasitol., Amsterdam, v.53, p.53-62, 1992.
- BONAMETTI, A. M., BASILE, M. A., VAZ, A. J., BALDY, J. L. S., TAKIGUTI, C. K. Índice de positividade da reação imunoenzimática (ELISA) para cisticercose no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro de pacientes com epilepsia. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, São Paulo, v.34, n.5, p.451-458, 1992.
- BRANDT, J. R. A., GEERTS, S., DE DEKEN, R., KUMAR, V., CEULEMANS, F., BRIJS, 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.
- BRUCK, I., ANTONIUK, S. A., WITTIG, E., ACCORSI, A. Neurocisticercose na infância. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.49, n.1, p.43-46, 1991.
- BUENO, E. C. , VAZ, A. J., MACHADO, L. R., LIVRAMENTO, J. A., MIELLE, S. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. J. Clin. Microbiol., v.38, n.1, p.146-151, 2000.
- CAMARGO, M. E. Sífilis. In: FERREIRA, A. W. & AVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p.177-184.
- CANELAS, H. M. Neurocisticercose: incidência, diagnóstico e formas clínicas. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v. 20, n.1, p.1-16, 1962.
- CANTÚ, C., BARINAGARREMENTERIA, F. Cerebrovascular complications of neurocysticercosis. Arch. Neurol., México, v.53, p.233-239, 1996.
- CÁRDENAS, F., PLANCARTE, A., QUIROZ, H., RABIELA, M. T., GÓMEZ-LEAL, A., CORREA, D., FLISSER, A. *Taenia crassiceps*: experimental model of intraocular cysticercosis. Exp. Parasitol., New York, v.69, p.324-329, 1989.

- CEPANZO (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS). Informe de la reunión técnica sobre normatización y estrategias para la implementación del inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana. Buenos Aires, 1989. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, São Paulo, v. 31, n.4, p.291-293, 1989.
- 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, n.6, p.825-827, 1992.
- CHAPMAN, A., VALLEJO, V., MOSSIE, K. G., ORTIZ, D., AGABIAN, N., FLISSER, A. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in egg detection assay. J. Clin. Microbiol., Washington, v.33, n.5, p.1283-1288, 1995.
- CHENG, R. W. K., KO, R. C. Purification of larval *Taenia solium* antigens by gel filtration. Vet. Parasitol., Amsterdam, v.43, p.65-73, 1992.
- CHOROMANSKI, L., ESTRADA, J.J., 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., Lawrence, v.76, n.1, p.69-73, 1990.
- CHUNG, J. Y., BAHK, Y. Y., HUH, S., KANG, S. Y., KONG, Y., CHO, S. Y. A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. J. Infect. Dis., Chicago, v.180, p.1307-1315, 1999.
- COOK, G. C. Neurocysticercosis: Parasitology, clinical presentation, diagnosis, and recent advances in management. Quarterly J. Med., Oxford, v.68, n.256, p.575-583, 1988.
- CORREA, M. D., PLANCARTE, A., SANDOVAL, M. A., RODRIGUEZ-DEL-ROSA, E., MEZA-LUCAS, A., FLISSER, A. Immunodiagnosis of human and porcine cysticercosis detection of antibodies and parasite products. Acta Leidensia, Leiden, v.57, n.2, p.93-99, 1989.
- COSTA, J. M., FERREIRA, A. W., MAKINO, M. M., CAMARGO, M. E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. Rev. Inst. trop. Med. São Paulo, São Paulo, v.24, n.6, p.337-341, 1982.

- Del BRUTTO, O. H., SOTELO, J. Neurocysticercosis: an update. Reviews of infectious diseases., Chicago, v.10, n.6, 1988.
- DENNIS, R. D., WIEGANDT, H. Glycosphingolipids of invertebrata as exemplified by a cestode platyhelminth, *Taenia crassiceps*, and dipteran insect, *Calliphora vicina*. Adv. Lipid Res., v.26, p.321-351, 1993.
- DIAS, R. M. D. S., SILVA, M. I. P. G., MANGINI, A. C. S., VELLOSO, S. A. G., TORRES, D. M. A. G. V., SILVA, R. M., VAZ, A. J. Ocorrência de *Taenia* sp. na população atendida no laboratório central do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil (1960/1989). Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, v.33, n.2, p.147-151, 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 IN PERU. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked-immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. Am. J. Trop. Med Hyg., Baltimore, v.46, n.5., p.610-615, 1992.
- DORAIS, F. J., ESCH, G. W. Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. Exper. Parasitol., New York, v. 25, p.395-398, 1969.
- DRAELANTS, E., BRANDT, J. R. A., KUMMAR, V., GEERTS, S. Characterization of epitopes on excretory-secretory antigens of *Taenia saginata* metacestodes recognized by monoclonal antibodies with immunodiagnostic potential. Parasite Immunol., Oxford, v.17, p.119-129, 1995b.
- DRAELANTS, E., HOFKENS, E., HARDING, E., BRANDT, J., GEERTS, S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. Res. Vet. Sci., London, v.58, p.99-100, 1995a.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyti. Chem., v.28, n.3, 1956.

- ESPINOZA, B., FLISSER, A. Antígenos específicos y de reacción cruzada de helmintos parásitos. Arch. Invest. Méd., México, v.17, p.299-311, 1986a.
- ESPINOZA, B., RUIZ-PALACIOS, G., TOVAR, A., SANDOVAL, M. A., PLANCARTE, A., FLISSER, A. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. J. Clin. Microbiol., Washington, v.24, n.4, p.536-541, 1986b.
- ESTRADA, J. J., ESTRADA, J. A., KUHN, R. E. Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hig., Baltimore, v.41, n.1, p.50-55, 1989.
- EV, L. V., MAIA, A. A., PIANETTI, G., NASCIMENTO, E. Immunological evaluation of a 26-kDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. Parasitol Res., v.85, p.98-102, 1999.
- EVANS, C. A. W., GONZALES, A. E., GILMAN, R. H., VERASTEGUI, M., GARCIA, H. H., CHAVERA, A., PILCHER, J. B., TSANG, V. C. W. Cysticercosis Working Group in Peru. Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for prevention of human disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., Baltimore, v.56, n.1, p.33-37, 1997.
- FAN, P. C., CHUNG, W. C., EOM, K. S., ITO, A. Vaccination trials against Taiwan *Taenia* eggs in pigs injected with frozen oncospheres of Taiwan *Taenia*, Korea *Taenia*, *T. saginata* or *T. solium*. Parasitol., London, v.114, p.541-544, 1997.
- FELDMAN, M., PLANCARTE, A., SANDOVAL, M., WILSON, M., FLISSER, A. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.84, p.559-562, 1990.
- FERREIRA, P. A., VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., SASAKI, A. T., FERREIRA, A. W., LIVRAMENTO, J. A. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent

- using homologous and heterologous antigens. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, São Paulo, v.39, n.1, p.29-33, 1997.
- FISHER, C., NOSRATIAN, R., HABTEMICHAEL, N., TOLLE, R., RIEMENSCHNEIDER, V., GEYER, E. Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis. Trop. Med. Parasitol., New York, v.45, p.324-328, 1994.
- FLISSER, A., PÉREZ-MONTFORT, R., LARRALDE, C. The immunology of human and animal cysticercosis: a review. Bull. World Health Organization, Geneve, v.57, n.5, p.839-856, 1979.
- FLISSER, A., WOODHOUSE, E., LARRALDE, C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. Exp. Immunol., Mexico, v.39, p.27-37, 1980.
- FLISSER, A., MADRAZO, I., GONZALES, D., SANDOVAL, M., RODRIGUEZ-CABAJAL, J., De-DIOS, J. Comparative analysis of human and porcine neurocysticercosis by computed tomography. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.82, p.739-742, 1988.
- FLISSER, A., RICKARD, M. D., PAWLOWSKI, Z. S., ESCOBEDO, F., OVERBOCH, D., van KNAPEN, F. Conclusions and recommendations, neurocysticercosis. XIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Acta Leidensia, Leiden, v. 57, n. 2, p.265-272, 1989.
- FLISSER, A., MADRAZO, I., DELGADO. Tratamiento. In: FLISSER, A., MADRAZO, I., DELGADO. Cisticercosis humana. México: El Manual Moderno, 1997, p. 33-42.
- FREEMAN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. Can. J. Zool., v.40, p.969-990, 1962.
- GARCIA, H. H., HERRERA, G., GILMAN, R. H., TSANG, V. C. W., PILCHER, J. B., DIAZ, J. F., CANDY, E. J., MIRANDA, E., NARANJO, J. & THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. Am. J. Med. Hyg. Baltimore, v.50, n.2, p.152-157, 1994.

- GARCIA, E., ORDOÑEZ, G., SOTELO, J. Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and Western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. J. Clin. Microbiol., Washington, v.33, n.12, p.3324-3352, 1995.
- GLASS, W. F., BRIDGGS, R. C., HNILICA, L. S. Use of lectins for detection of eletrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. Anal. Biochem. New York, v.115, p.219-224, 1981.
- GOTTSTEIN, B., ZINI, D., SCHANTZ, P. M. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. Trop. Med. Parasit., New York, v.38, p.299-303, 1987.
- GRISOLIA, J. S., WIEDERHOLT, W. C. CNS Cysticercosis. Arch. Neurol., Chicago, vol.39, p. 540-544, 1982.
- GROGL, M., ESTRADA, J. J., MacDONALD, G., KUHN, R. E. Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. J. Parasitol., Lawrence, v.71, n.4, p.433-422, 1985.
- 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. Parasit. Immunol., Oxford, v.11, p.351-370, 1989.
- HAYUNGA, E. G., SUMMER, M., P., RHOADS, M. L., MURREL, D. K., ISENSTEIN, R. S. Development of a serologic assay for cysticercosis, using an antigen isolated from *Taenia* ssp cyst fluid. Am. J. Vet. Res., v.52, n.3, 1991.
- HENRY, J. B. Cestódio: Cisticercose. In: HENRY, J. B. Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais. São Paulo: Monole Ltda., 1995. p.1409-1410.
- HUBERT, K., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., MICHAULT., A., FROSCH, M., MÜHLSCHLEGEL, F. A. Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticerci. Clin. Diagn. Lab. Immunol., Washington, v.6, n.4, 1999.

- ITO, A. Basic and applied immunology in cestode infections: from *Hymenolepis* to *Taenia* and *Echinococcus*. Intern. J. Parasitol., Oxford, v.27, n.10, p.1203-1211, 1997.
- ITO, A., PLANCARTE, A., MA, L., KONG, Y., FLISSER, A., CHO, S. Y., LIU, Y. H., KAMHAWI, S., LIGHTOWLERS, M. W., SCHANTZ, P. M. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., Baltimore, v. 59, n. 2, p. 291-294, 1998.
- ITO, A., PLANCARTE, A., NAKAO, M., NAKAYA, K., IKEJIMA, T., PIAO, Z. X., TANAZAWA, T., MARGONO. ELISA and immunoblot using purified glycoproteins for serodiagnosis of cysticercosis in pigs naturally infected with *Taenia solium*. J. Helmentol., v.73, p.363-365, 1999.
- JOHNSON, K. S., HARRISON, G. B. L., LIGHTOWLERS, M. W., O'HOY, K. L., COUGLE, W. G., DEMPSTER, R. P., LAWRENCE, S. B., VINTON, J. G., HEATH, D. D., RICKARD, M. D. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. Nature, London, v.338, p.585-587, 1989.
- KALINNA, B., GEYER, E., WALTHER, M. Purification of an antigen from the *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid highly sensitive in detecting IgG-antibodies (ELISA) in cavels with experimental cysticercosis. J. Vet. Med., Berlin, v.37, p.213-221, 1990.
- KAUR, M., GOYAL, R., GANGULY, N. K., MAHAJAN, R. C., MALLA, N. Evaluation and characterization of purified antigenic fraction-II of *Cysticercus cellulosae* by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of neurocysticercosis before and after treatment. Immunol. Infecti. Dis. Baltimore, v.6, p.25-29, 1996.
- KO, R. C. & NG, T. F. Purification of larval *Taenia solium* antigens by isoelectric focusing. Vet. Parasitol. Res., v.74, p.191-202, 1998a.
- KO, R. C. & NG, T. F. Specificity of isoelectric focusing-purified antigens in the diagnosis of human cysticercosis. Parasitol Res., Berlin, v.84, p.565-569, 1998b.

- KUMAR, D., GAUR, S. N. S. Serodiagnosis of porcine cysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using fractionated antigens. Vet. Parasitol., Amsterdam, v.24, p.195-202, 1987.
- KUNZ, J., BAUMEISTER, S., DENNIS, R. D., KÜYTZ, B., WIEGANDT, H., GEYER, E. Immunological recognition of larval *Taenia crassiceps* glycolipids by sera from parasite-infected mice. Parasitol. Res., Berlin, v.77, p.443-447, 1991.
- KUNZ, J., KALINNA, B., WATSCHKE, V., GEYER, E. *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. Zbl. Bakt., Alemanha, v. 271, p.510-520, 1989.
- LACLETTE, J. P., LANDA, A., ARCOS, L., WILLS, K., DAVIS, A. E., SHOEMAKER, C. B. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). Mol. Biochem. Parasitol., Amsterdam, v.44, p.287-296, 1991.
- LAEMMI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LAMBIN, P., ROCHU, D., FINE, J. M. A new method for determination of molecular weights by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gradient gel. Anal. Biochem. New York, v.74, p.567-575, 1976.
- LAMSAM, S., McMANUS, D. P. Molecular characterization of the surface and cyst fluid components of *Taenia crassiceps*. Parasitol., London, v.101, p.115-125, 1990.
- LANDA, A., MERCHANT, M. T., WILLMS, K., LACLETTE, J. P. Purification and ultrastructural localization of surface glycoproteins of *Taenia solium* (Cestoda) cysticerci. Int. J. Parasitol., Oxford, v.24, n.2, p.265-269, 1994.
- LANGE, O. Síndrome líquórica da cisticercose encéfalo-meníngea. Rev. Neuro. Psiquiatria, São Paulo, v.6, n.2, p.35-47, 1940.
- LARRALDE, C., LACLETTE, J. P., OWEN, C. S., MADRAZO, I., SANDOVAL, M., BOJAILIL, R., SCIUTTO, E., CONTRERAS, L., ARZATE, J., DIAZ, M. L., GOVEZENSKY, T., MONTOYA, R. M., GOODSID, F.

- Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. Am. J. Trop. Med. Hyg., Baltimore, v.53, n.5, p.965-973, 1986.
- LARRALDE, C., SOTELO, J., MONTOYA, R. M., PALENCIA, G., PADILLA, A., GOVEZENSKY, T., DIAZ, M. L., SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Arch. Pathol. Lab. Med., Chicago, v.144, p.926-928, 1990.
- LIVRAMENTO, J. A. Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.39, n.3, p.261-278, 1981.
- LIVRAMENTO, J. A., COSTA, J. M., MACHADO, L. R., NOBREGA, J. P. S., SPINA-FRANÇA. ELISA (IgG e IgM) no LCR e no soro na neurocisticercose em tratamento com praziquantel. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.45, n.3, p.267-274, 1985.
- LIVRAMENTO, J. A., MACHADO, L. R., WHITAKER, J. N., SPINA-FRANÇA, A. Proteína básica de mielina no líquido cefalorraqueano na neurocisticercose. Arch. Neuro. Psiquiatr. São Paulo, São Paulo, v.43, n.2, 1985b.
- LIVRAMENTO, J. A. Síndrome do líquido cefalorraqueano na neurocisticercose. Arq. Neuropsuiatr., São Paulo, v.45, n.3, p.261-275, 1987.
- LIVRAMENTO, J. A., MACHADO, L. R., SPINA-FRANÇA, A. Immunobiology of neurocysticercosis. In: Congress of the International Child Neurology Association, Amsterdam, p.307-312, 1993.
- LONARDONI, M. V. C., BERTOLINI, D. A., SILVEIRA, T. G. V., ARRAES, M. A. A., SVIDZINSKI, T. I. E., CARDOSO, R. F., GOMES, M. L., DIAS, M. L. G. G., VISENTAINER, J. E. L., MISUTA, N. M., RAMOS, M., SIQUEIRA, V. L. D. Frequência de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em indivíduos de cinco municípios da região norte do Estado do Paraná – Brasil. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v.30, n.3, p.273-279, 1996.

- LOWRY, H. L., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.
- MAASS, M., DELGADO, E., KNOBLOCH, J. Isolation of an immunodiagnostic *Taenia solium* coproantigen. Trop. Med. Parasitol., London, v.43, p.201-202, 1992.
- MACHADO, L. R. Líquido cefalorraqueano e neurocisticercose. Aspectos evolutivos da resposta inflamatória celular. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.45, n.4, p.353-363, 1987.
- MACHADO, A. B. B., PIALARISSI, C. S. M., VAZ, A. J. Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral, São Paulo, SP (Brasil). Rev. Saúde públ., São Paulo, v.22, n.3, p.240-244, 1988.
- MACHADO, L. R., NOBREGA, J. P. S., BARROS, N. G., LIVRAMENTO, J. A., BACHESCHI, L. A., SPINA-FRANÇA, A. Computed tomography in neurocysticercosis. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.48, n.4, p.414-418, 1990.
- MAHAJAN, R. C. Geographical distribution of human cysticercosis. In: FLISSER, A. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. New York, Academic Press, 1982, p.39-46.
- MANOUTCHARIAN, K., ROSAS, G., HERMANDEZ, M., FRAGOSO, G., ALUJA, A., VILLALOBOS, N., RODARTE, L. F., SCIUTTO, E. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. J. Parasitol., Lawrence, v.82, n.2, p.250-254, 1996.
- McMANUS, D. P. Molecular technology: improving strategies for controlling hydatid disease and cysticercosis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health., Bangkok, v.21, n.2, p. 161-173, 1990.
- MICHAULT, A., RIVIÈRE, B., FRESSY, P., LAPORTE, J. P., BERTIL, G., MIGNARD, C. Apport de l'enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay au diagnostic de la neurocysticercose humaine. Pathol. Biol., Paris, v.38, n.2, p.119-125, 1990.

- MICHEL, P., MICHAULT, A., GRUEL, J. C., COULANGES, P. Le serodiagnostic de la cysticerose par ELISA et Western Blot. Arch. Inst. Pasteur Madagascar, Madagascar, v.57, n.1, p.115-142, 1990.
- MOHAMMAD, I. N., HEINER, D. C., MILLER, B. L., GOLDBERG, M. A., KAGAN, I. G. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. J. Clin. Microbiol., Washington, v.20, n.4, p.775-779, 1984.
- MONTENEGRO, T., GILMAN, R. H., CASTILLO, 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*, *Echinococcus granulosus*, and *Hymenolepis nana*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, São Paulo v.36, n.4, p.327-334, 1994.
- MOSES, A. Dos metodos biologicos de diagnostico nas cisticercozes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.3, p.320-327, 1911.
- NASCIMENTO, E., TAVARES, C. A., LOPES, J. D. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with purified by monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol., Washington, v.25, n.7, p.1181-1185, 1987.
- NEVES, D. P. Teníase e Cisticercose. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu, 1987, p.211-223.
- ONYONGO-ABUJE, J. A., HUGHES, G., OPICHA, M., NGINYI, K. M., RUGUTT, M. K., WRIGHT, S. H., HARRISON, L. J. S. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. Vet. Parasitol., Amsterdam, v.61, p.221-230, 1996.
- OVERBOSH, D. Neurocysticercosis. Schweiz. Med. Wschr. v.122, n.23, p.893-898, 1992.
- PAMMENTER, M. D. & ROSSOUW, E.J. The value of an antigenic fraction of *Cysticercus cellulosae* in the serodiagnosis of cysticercosis. An. Trop. Med. Parasitol., London, vol.81, n.2, p.117-123, 1987.
- PAMMENTER, M. D., ROSSOUW, E. J., DINGLE, C. E. Serological detection of cysticercosis in two rural areas of South Africa. Transact. of the Royal Soc. Trop. Med. Hyg. v.81, p.242-244, 1897.

- PAMMENTER, M. D., EPSTEIN, S. R., REES, R. T. Cross reactions in the immunodiagnosis of schistosomiasis and cysticercosis by a cerebrospinal fluid enzyme-linked immunosorbent assay. Transact. of the Royal Soc. Trop. Med. Hyg., v.86, p.51-52, 1992.
- PARKHOUSE, R. M. E., HARRISON, L. J. S. Antigens of parasitic helminths in diagnosis, protection and pathology. Parasitol., Amsterdam, v.99, p.5-19, 1989.
- PARKHOUSE, R. M. E., HARRISON, L. J. S. Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia* sp. metacestodes. Parasite Immunol., Oxford, v.9, p.263-268, 1987.
- PÊSSOA, S. B., MARTINS, A. M. Cisticercose. In: PÊSSOA, S. B., AMILCAR, V. M. Parasitologia Médica Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1988. p.448-464.
- PIALARISSI, C. S. M., VAZ, A. J., SOUZA, A. M. C., NAKAMURA, P. M., CAMARGO, E. D., SILVA, M. V., UEDA, M. Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, São Paulo, v.29, n.6, p.367-373, 1987.
- PINTO, P. S. A. Diagnóstico imunológico da cisticercose suína como contribuição à inspeção de carnes. São Paulo, 1998. Tese de doutorado apresentado a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
- PLANCARTE, A., FEXAS, M., FLISSER, A. Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. Int. J. Parasitol., Oxford, v.24, n.5, p.733-738, 1994.
- REY, L. Cisticercose humana. In: REY, L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973, p.428-440.
- RODRIGUEZ-CANUL, R., ALLAN, J. C., FLETES, C., SUTISNA, I. P., KAPTI, I. N., CRAIG, P. S. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. Clin. Diag. Lab. Immunol., Washington, v.4, n.5, p.579—582, 1997.

- RODRIGUEZ-CANUL, R., ALLAN, J. C., DOMINGUEZ, J. 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, p.165-180, 1998.
- RODRIGUEZ-DEL-ROSAL, E., CORREA, D., FLISSER, A. Swine cysticercosis: Detection of parasite products in serum. Veterinary Record, London, v.6, p.488, 1989.
- ROLFS, A., MÜHLSCHLEGEL, F., JANSEN-ROSSECK, R., MARTINS, A. R., BEDAQUE, E. A., TAMBURUS, W. M., PEDRETTI, L., SCHULTE, G., FELDMEIER, H., KREMSNER, P. Clinical and immunologic follow-up study of patients with neurocysticercosis after treatment with praziquantel. Neurology, v.45, p.532-538, 1995.
- SBIHI, Y., JANSSEN, D., OSUNA, A. Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., v.24, p.205-211, 1996.
- SCHANTZ, P. M., SHANKS, D., WILSON, M. Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. Trop. Med. Hyg., v.29, n.4, p.609-612, 1980.
- SIEBERT, A. E., GOOD, A. H. Jr, SIMMONS, J. E. Ultrastructural aspects of early immune damage to *Taenia crassiceps* metacestodes. Intern. J. Parasitol., v.8, p.45-53, 1978.
- SIEBERT, A. E., GOOD, A. H. Jr. *Taenia crassiceps*: effect and immune serum on metacestodes *in vitro*. Exper. Parasitol., New York, v.48, p.164-174, 1979.
- SIEBERT, A. E., GOOD, A. H. *Taenia crassiceps*: immunity to metacestodes in Balb/c and bdf1 mice. Exper. Parasitol., New York, v.50, p.437-446, 1980.
- SIMAC, C., MICHEL, P., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., ESTERRE, P., MICHAULT, A. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis. Parasitol Res., Berlin, v.81, p.132-136, 1995.

- SOTELO, J., GUERRERO, V., RUBIO, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. Arch. Intern. Med., Chicago, v.145, p.442-445, 1985.
- SOUSA, A. Q., SA, H. L. C., QUEIROZ, T. R. B. S., HORTA, W. G., PEARSON, R. D. Neurocysticercosis in Ceará State, Northeastern Brazil: a review of 119 cases. Am. J. Trop. Med. Hyg., Baltimore, v.58, n.6, p.759-762, 1998.
- SPINA-FRANÇA, A. Cisticercose do sistema nervoso central. Rev. Paulista de Med., São Paulo, v.48, p.60-70, 1956.
- SPINA-FRANÇA, A. Aspectos biológicos da neurocisticercose: alterações do líquido cefalorraquidiano. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.20, n.1, p.17-30, 1962.
- SPINA-FRANÇA, A. Imunobiologia da cisticercose: avaliação dos conceitos atuais. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.27, n.2, 1969.
- SPINA-FRANÇA, A., NÓBREGA, J. P. S. Neurocisticercose e praziquantel. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.39, n.3, p.279-285, 1981.
- SPINA-FRANÇA, A., REZENDE, G. L. Alteraciones del líquido cefalorraquídeo con el praziquantel. Epoca, México, v.24, n.6, p.633-636, 1982.
- SPINA-FRANÇA, A., LIVRAMENTO, J. A., MACHADO, L. R. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.51, n.1, p.16-20, 1993.
- TAKAYANAGUI, O. M., JARDIM, E. Aspectos clínicos da neurocisticercose. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.41, n.1, p.50-62, 1983.
- TAKAYANAGHI, O. M. Neurocisticercose. Arq. Neuropsiquiatr., São Paulo, v.48, n.1, p.11-15, 1990.
- TAKAYANAGHI, O. M., JARDIM, E. Therapy for neurocysticercosis comparison between albendazole and praziquantel. Arch. Neurol., São Paulo, v.49, p.290-294, 1992.
- TÉLEZ-GIRÓN, E., RAMOS, M.C., DOFOUR, L., ALVAREZ, P., MONTANTE, M. Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by DOT enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-

- ELISA) and standard ELISA. Am. J. Trop. Med. Hyg. Baltimore, v.37, n.1, p.169-173, 1987.
- TOLEDO, A., LARRALDE, C., FRAGOSO, G., GEVORKIAN, G., MANOUTCHARIAN, K., HERNÁNDEZ, M., ACERO, G., ROSAS, G., LÓPEZ-CASILLAS, F., GARFIAS, C. K., VÁZQUEZ, R., TERRAZAS, I., SCIUTTO, E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. Infection Immunity., Bethesda, v.67, n.5, p.2522-2530, 1999.
- TRIMBLE, J. J., LUMSDEN, R. Cytochemical characterization of tegument membrane-associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae. J. Parasitol., Lawrence, v.61, n.4, p.665-676, 1975.
- TSANG, V. G. W., BRAND, J. A., BOYER, A. E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*). J. Infect. Dis., Chicago, v.159, n.1, p.50-59, 1989.
- TSANG, V. C. W., PILCHER, J. A., ZHOU, W., BOYER, A. E., KAMANGO-SOLLO, E. I. P., RHOADS, M. L., MURREL, K. D., SCHANTZ, P. M., GILMAN, R. H. 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. Immunopath., Amsterdam, v.29, p.69-78, 1991.
- VALDEZ, F., HERNÁNDEZ, M., GOVEZENSKY, T., FRAGOSO, G., SCIUTTO, E. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. J. Parasitol., v.80, n.6, p. 931-936, 1994.
- VAZ, A. J. & FERREIRA, A. W. Imunodiagnóstico da Neurocisticercose: teste imunoenzimático com antígenos quimicamente ligados a suportes para pesquisa de anticorpos em soro e líquido cefalorraquiano. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, v. 30, n.1, p.1-10, 1988.
- VAZ, A. J., HANASHIRO, A. S. G., CHIEFFI, P. P., FERREIRA, A. W. Frequência de indivíduos com anticorpos séricos anti-*Cysticercus*

- cellulosae* em cinco municípios do estado de São Paulo. Rev. da Soc. Brasil. Med. Trop., São Paulo, v. 23, n. 2, p. 97-99, 1990.
- VAZ, A. J. *Cysticercus longicollis* Caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquidos cefalorraquiano no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo 1993.
- VAZ, A. J. Neurocisticercose: Aspectos biológicos, imunológicos e epidemiológicos In: MACHADO, L. R., LIVRAMENTO, J. A., SPINA-FRANÇA, A. N., NÓBREGA, J. P. S. Neuroinfecção São Paulo, 1996. p.181-192.
- VAZ, A. J., LIVRAMENTO, J. A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A. W. & AVILA, S. L. M. In: Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p.177-184.
- VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., CAMARGO, M. E., CAMARGO, E. D., FERREIRA, A. W. Dot-ELISA for detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in cerebrospinal fluid using a new solid phase (resin-treated polyester fabric) and *Cysticercus longicollis* antigens. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, São Paulo, v.38, n.6, p.391-396, 1996.
- 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. Med. Hyg., Baltimore, v.57, n.3, p354-357, 1997.
- VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., BARRETO, C. C., FERREIRA, A. W., LIVRAMENTO, J. A., MACHADO, A. B. B. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: use of heterologous antigenic particles (*Cysticercus longicollis*) in indirect immunofluorescence test. Serodiagnosis Immunotherapy Infectious Disease., v.8, p.157-161, 1997a.
- VELASCO-CASTREJÓN, O., GUTIÉRREZ-QUIROZ, M., ROMERO, V. GUZMÁN-BRACHO, C. Detección de antígenos solubles de *Cysticercus*

- cellulosae* en líquido cefalorraquídeo como medio diagnóstico en neurocisticercosis. Rev. Latinoamer. Microbiol., México, v.31, p.235-239, 1989.
- VIANNA, L. G., MACÊDO, V., COSTA, J. M., MELLO, P., SOUZA, D. Estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em Brasília, Distrito Federal. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., São Paulo, v.19, n.3, p.149-156, 1986.
- VIANNA, L. G., MACÊDO, V., COSTA, J. M. Cisticercose músculo-cutânea e visceral – doença rara ?. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, São Paulo, v.33, n.2, p.129-136, 1991.
- WHITE, A. C. Jr. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. Clin. Infect. Dis., Chicago, v.24, p.101-115, 1997.
- WILKINS, P. P., ALLAN, J. C., VERASTEGUI, M., ACOSTA, M., EASON, A. G., GARCIA, H. H., GONZALES, A. E., GILMAN, R. H., TSANG, V. C. W. Development of a serologic assay detect *Taenia solium* taeniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., Baltimore, v.60, p.199-204, 1999.
- WOODWARD, M. P., YOUNG, JR., W. W., BLOODGOOD, R. A. Detection of a monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J. Immunol. Methods, Amsterdam, v.78, p.143-145, 1985.
- YANG, H.-J., CHUNG, J.-Y., YUN, D.-H., KONG, Y., ITO, A., MA, L., LIU, Y.-H., LEE, S.-C., KANG, S.-Y., CHO, S.-Y. Immunoblot analisys of a 10kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. Parasite Immunol., Oxford, v.20, p.483-488, 1998.
- ZARLENGA, D. S., RHOADS, M. L., AL-YAMAN, F. M. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. Mol. Biochem. Parasitol., Amsterdam, v.67, p.215-223, 1994.

ANEXOS

Anexo	Assunto	
I	Soluções e Reagentes	93
II	Resultados gerais teste de pré oxidação	95
III	Resultados gerais teste tratamento enzimático	97
IV	Resultados gerais de ELISA com amostras do Grupo NC	98
V	Resultados gerais de ELISA com amostras do Grupo Controle	99
VI	Resultados gerais de ELISA com amostras do Grupo NC (em diferentes fases evolutivas)	100
VII	Resultados gerais de teste ELISA com amostras do Grupo Outras Patologias	102
VIII	Resultados gerais de testes ELISA: ensaio de reprodutibilidade	103

ANEXO I

SOLUÇÕES E REAGENTES

1. Utilizadas em SDS-PAGE:

- a. *Solução tampão de amostra 5 vezes concentrado*: Tris-hidroximetilaminoetano (Tris) – HCl 0,06M pH 6,8 (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Alemanha), SDS 2% (Sigma Chem. Co.), glicerol 25% (Reagen Quimibras Indústrias SA), 2-mercaptoetanol Tipo I 0,014M (Sigma Chem. Co.), e azul de bromofenol 0,1% (Sigma Chem. Co.), em água destilada.
- b. *Gel de separação de 7 a 20% e de 12, 15%*: acrilamida 7%, 20% (Sigma Chem. Co.) e bis-acrilamida 0,2% (Sigma Chem. Co.) – para gel de 7-20%; e bis-acrilamida 0,2% (Sigma Chem. Co.); acrilamida 15% (Sigma Chem. Co.) e bis-acrilamida 0,2% (Sigma Chem. Co.) – para gel de 15%; acrilamida 12% (Sigma Chem. Co.) e bis-acrilamida 0,2% (Sigma Chem. Co.) – para gel de 12%; todos em solução tamponada Tris-HCl 1,5M pH 8,8 com SDS 0,1%.
- c. *Gel de empilhamento de 5%*: acrilamida 5%(Sigma Chem. Co.) e bis-acrilamida 0,1%(Sigma Chem. Co.) em Tris-HCl 0,5M pH 6,8, contendo 0,25% de SDS.
- d. *Solução tampão de corrida pH 8,3*: Tris 0,025M (Serva Feinbiochemica GmbH & Co.), glicina 0,129M (Sigma Chem. Co.) e SDS 0,1% em água destilada.
- e. *Solução fixadora*: metanol 40% (Merck SA Indústrias Químicas) e ácido acético 10% (Merck SA Indústrias Químicas) em água destilada.
- f. *Solução corante Coomassie*: Coomassie Brilliant Blue R-250 1% (Sigma Chem. Co.), ácido acético 10% e metanol 45% em água destilada.
- g. *Solução descorante*: ácido acético 7% em água destilada.

2. Para ELISA:

- a. *Solução tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6*: Na_2CO_3 0,1M (Serva Feinbiochemica GmbH & Co.) e NaHCO_3 0,1M (Serva Feinbiochemica GmbH & Co.) em água destilada.
- b. *Solução Salina*: NaCl 0,15M em água destilada.
- c. *Solução salina tamponada com fosfatos 0,01M pH 7,2 (PBS)*: Na_2HPO_4 0,0075M, NaH_2PO_4 0,025M (Reagen Quimibras Indústrias SA, RJ, Brasil) e NaCl 0,14M (Merck SA Indústrias Químicas, RJ, Brasil) em água destilada.
- d. *Solução de lavagem*: salina com 0,05% Tween 20 (Merck, Schuchardt, Munchen, Alemanha).
- e. *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 (Merck, Schuchardt, Munchen, Alemanha).

- f. *Solução diluente*: solução de leite a 1% em PBS pH 7,2 com 0,05% Tween 20 (Merck, Schuchardt, Munchen, Alemanha).
- g. *Solução cromógena tetrametilbenzidina (TMB)*: pronto para uso (Roche)
- h. *Solução cromógena ortofenilenodiamina (OPD)*: ortofenilenodiamina 1g/l (Sigma Chem. Co.) e H₂O₂ 1ml/l (Reagen Quimibras Indústrias SA), em tampão citrato/fosfato 0,2M pH 5,0.

3. Para IMUNOBLOT antígenos ConA-Tcra e GP-Tcra

- a. *Solução de lavagem*: tampão de lavagem Tris-HCl 0,02M, NaCl 0,5M (Merck SA Indústrias Químicas, RJ, Brasil) em água destilada.
- b. *Tampão de bloqueio, diluente de amostra e conjugado*: solução de leite (leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% Tween 20 (Merck, Schuchardt, Munchen, Alemanha).
- c. *Tampão diluente de substrato NBT/BCPI*: Tris-HCl 0,1M (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Alemanha).

4. Para IMUNOBLOT antígeno LV-Tcra

- a. *Solução tamponada de transferência pH 8,3*: Tris 0,025M, glicina 0,192M e metanol 20% em água destilada.
- b. *Solução corante Ponceau*: Ponceau-S 0,5% I (Sigma Chem. Co.) em água destilada.
- c. *Solução de Lavagem*: PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 (PBS-T).
- d. *Solução bloqueadora*: leite a 5% em PBS-T.
- e. *Solução diluente*: leite a 1% em PBS-T.
- f. *Solução cromógena diaminobenzidina (DAB) substrato*: diaminobenzidina 0,017% (Sigma Chem. Co.) e H₂O₂ 5% em PBS pH 7,2.

ANEXO II

RESULTADOS GERAIS - TESTE DE OXIDAÇÃO

Tabela 1: ELISA com o antígeno LV-Tcra em presença de ácido periódico nas concentrações (10mM, 50mM, 200mM, 1M e 2M) e reação controle, com amostra de soro diluída 1/100, com conjugado anti-IgG humano peroxidase.

Periodato de Sódio	D.O. Soro 1/100	% de Oxidação
0	3,33	
10mM	3,02	9
50mM	2,94	12
200mM	2,74	18
1M	2,70	20
2M	2,63	21

Tabela 2: ELISA com o antígeno ConA-Tcra em presença de ácido periódico nas concentrações (10mM, 50mM, 200mM, 1M e 2M) e reação controle, com amostra de soro diluída a 1/100, com conjugado anti-IgG humano peroxidase.

Periodato de Sódio	D.O. Soro 1/100	% de Oxidação
0	2,68	
10mM	2,51	6
50mM	2,34	13
200mM	2,18	19
1M	2,08	22
2M	2,05	24

Tabela 3: ELISA com o antígeno GP-Tcra em presença de ácido periódico nas concentrações (10mM, 50mM, 200mM, 1M e 2M) e reação controle, com amostra de soro diluída 1/100 e 1/200, com conjugado anti-IgG humano peroxidase.

Periodato de Sódio	D.O. Soro 1/100	% de Oxidação
0	3,08	
10mM	2,68	13
50mM	2,61	15
200mM	2,39	22
1M	2,35	24
2M	2,35	24

Tabela 4: ELISA com os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra em presença de ácido periódico na concentração (200mM) e reação controle, com amostras de LCR diluído a 1:2, com conjugado anti-IgG humano peroxidase.

Antígeno	ConA-Tcra	ConA-Tcra	ConA-Tcra	LV-Tcra	LV-Tcra	LV-Tcra
Amostra	Sem Periodato	200 mM Periodato	% de Oxidação	Sem Periodato	200 mM Periodato	% de Oxidação
4	1,269	0,555	57 %	1,113	0,838	25 %
10	1,706	0,438	25 %	1,722	1,253	25 %
12	0,576	0,291	50 %	0,840	0,607	28 %
13	0,731	0,543	26 %	0,553	0,397	28 %
15	0,447	0,219	52 %	0,573	0,349	29 %
16	0,909	0,268	71 %	0,835	0,225	40 %
20	0,218	0,110	50 %	0,298	0,190	74 %

ANEXO III

RESULTADOS GERAIS - TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM AS ENZIMAS
PROTEINASE K E TRIPSINA

Tabela 5: ELISA com os extratos antigênicos LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra em presença das enzimas proteolíticas proteinase K e tripsina em diferentes concentrações (50 e 500µg/ml) e reação controle sem tratamento, em teste com amostra de soro positivo para NC.

Antígeno	LV-Tcra	LV-Tcra	ConA-Tcra	ConA-Tcra	GP-Tcra	GP-Tcra
	D.O. Soro *1:100	% de Digestão	D.O. Soro *1:100	% de Digestão	D.O. Soro *1:100	% de Digestão
Sem Enzima	2,42		1,01		2,248	
50 µg/ml PK	1,10	55	0,03	> 95 %	0,318	68
500 µg/ml PK	0,69	71	0,03	> 95 %	0,318	78
50 µg/ml Tripsina	0,55	77	0,26	74 %	0,690	85
500 µg/ml Tripsina	0,55	77	0,12	80 %	0,499	85

*diluição do soro

ANEXO IV:

RESULTADOS GERAIS AMOSTRAS DE LCR GRUPO NEUROCISTICERCOSE

Tabela 6: Resultados de ELISA das 29 amostras de LCR Grupo NC ensaiadas com os extratos antigênicos de *T. solium*, LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra.

Antígeno	<i>T.solium</i>	Resultado	LV-Tcra	Resultado	ConA-Tcra	Resultado	GP-Tcra	Resultado
Teste	ELISA IgG		ELISA IgG		ELISA IgG		ELISA IgG	
	Índice		D.O.		D.O.		D.O.	
Cut-Off	1,2		0,23		0,22		0,21	
Amostra	LCR		LCR		LCR		LCR	
1	2,3	R	1,29	R	2,61	R	0,40	R
2	2,6	R	Mi	R	0,45		...	
3	0,6	NR	0,40	R	0,33	R	...	
4	4,5	R	3,54	R	3,74	R	...	
5	3,1	R	3,25	R	2,02	R	...	
6	2,6	R	1,35	R	2,45	R	...	
7	3,8	R	3,68	R	3,74	R	...	
8	4,3	R	3,48	R	3,51	R	...	
9	3,6	R	3,57	R	2,36	R	0,46	R
10	3,5	R	3,53	R	3,54	R	1,10	R
11	1,1	INC.	0,24	R	0,45	R	...	
12	3,6	R	2,57	R	3,67	R	0,51	R
13	1,2	R	1,04	R	0,78	R	0,31	R
14	1,0	INC.	0,97	R	0,91	R	...	
15	2,0	R	0,98	R	1,08	R	...	
16	1,5	R	0,85	R	1,15	R	...	
17	2,2	R	3,41	R	1,35	R	...	
18	1,3	R	0,86	R	0,58	R	0,45	R
19	2,5	R	2,30	R	3,09	R	0,62	R
20	0,8	INC.	0,76	R	0,44	R	0,25	R
21	2,5	R	1,15	R	1,84	R	0,21	R
22	0,9	INC.	0,42	R	0,55	R	0,24	R
23	1,4	R	3,90	R	0,67	R	1,75	R
24	3,7	R	0,30	R	0,53	R	0,29	R
25	0,6	NR	1,09	R	0,69	R	0,30	R
26	5,4	R	3,67	R	3,72	R	2,53	R
27	1,2	R	0,38	R	0,24	R	...	
28	1,5	R	3,61	R	3,80	R	3,41	R
29	1,3	R	3,64	R	3,68	R	...	

R= reagente NR= não reagente INC.= inconclusivo Mi= material insuficiente D.O.= densidade óptica

...=amostras não ensaiadas

ANEXO V:

RESULTADOS GERAIS AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE

Tabela 7: Resultados de ELISA das amostras do Grupo Controle ensaiadas com os extratos antigênicos de LV-Tcra, ConA-Tcra e GP-Tcra.

Antígeno	LV-Tcra	Resultado	ConA-Tcra	Resultado	GP-Tcra	Resultado
Teste	ELISA IgG		ELISA IgG		ELISA IgG	
Cut-Off	0,23		0,22		0,21	
	D.O.		D.O.		D.O.	
Amostra	LCR		LCR		LCR	
1	0,13	NR	0,12	NR	...	
2	0,19	NR	0,12	NR	...	
3	0,16	NR	0,10	NR	0,19	NR
4	0,14	NR	0,14	NR	...	
5	0,11	NR	0,11	NR	...	
6	0,15	NR	0,15	NR	...	
7	0,17	NR	0,17	NR	...	
8	0,16	NR	0,10	NR	0,19	NR
9	0,14	NR	0,12	NR	...	
10	0,12	NR	0,18	NR	...	
11	0,19	NR	0,14	NR	...	
12	0,17	NR	0,17	NR	...	
13	0,15	NR	0,15	NR	0,19	NR
14	0,15	NR	0,13	NR	0,19	NR
15	0,13	NR	0,14	NR	0,18	NR
16	0,18	NR	0,18	NR	...	
17	0,17	NR	0,16	NR	...	
18	0,12	NR	0,10	NR	0,17	NR
19	0,11	NR	0,16	NR	...	
20	0,14	NR	0,12	NR	0,20	NR
21	0,13	NR	0,13	NR	0,19	NR
22	0,16	NR	0,11	NR	0,17	NR
23	0,13	NR	0,18	NR	...	
24	0,11	NR	0,12	NR	...	
25	0,10	NR	0,14	NR	...	
26	0,12	NR	0,14	NR	...	
27	0,10	NR	0,10	NR	...	
28	0,10	NR	0,10	NR	...	
29	0,11	NR	0,11	NR	...	
Média	0,14		0,13		0,18	
Desvio padrão	0,03		0,03		0,01	

NR= não reagente ... = amostra não ensaiada

ANEXO VI:

RESULTADOS GERAIS DE AMOSTRAS DE LCR POSITIVAS PARA NC EM DIFERENTES FASES EVOLUTIVAS DO PARASITA

Antígeno	Classificação	ConA-Tcra	Resultado	GP-Tcra	Resultado
Cut-Off		0,22		0,21	
		D.O.		D.O.	
Teste		ELISA IgG		ELISA IgG	
Amostra	Tipo	LCR		LCR	
1	II	0,43	R	...	
2	III	2,99	R	...	
3	Misto	3,08	R	...	
4	Misto	3,30	R	...	
5	Misto	1,57	R	...	
6	III	0,37	R	...	
7	I	1,27	R	...	
8	Misto	0,51	R	...	
9	III	0,18	NR	0,18	NR
10	III	2,82	R	...	
11	IV	0,53	R	...	
12	Ventricular	3,57	R	...	
13	Misto	1,14	R	...	
14	IV	1,61	R	...	
15	Misto	0,32	R	...	
16	Misto	0,60	R	...	
17	Misto	1,86	R	...	
18	II	0,69	R	...	
19	II	0,61	R	...	
20	Misto	0,70	R	...	
21	IV	0,61	R	...	
22	Misto	2,16	R	...	
23	III	3,61	R	...	
24	Misto	1,44	R	...	
25	II	0,45	R	...	
26	IV	1,00	R	...	
27	Misto	1,83	R	...	
28	Misto	0,56	R	...	
29	III	0,39	R	...	
30	III	0,39	R	...	
31	II	0,88	R	...	
32	I	1,53	R	...	
33	Misto	0,39	R	...	
35	...	0,95	R	...	
36	Misto	1,83	R	...	
37	IV	0,33	R	...	
38	III	0,33	R	...	
39	Misto	0,74	R	...	
40	Misto	0,36	R	...	

41	I	0,96	R	...	
42	IV	3,01	R	...	
43	II	3,22	R	...	
44	III	0,51	R	...	
45	IV	3,50	R	...	
46	IV	1,13	R	...	
47	IV	1,07	R	...	
48	...	3,59	R	...	
51	III	0,15	NR	0,18	NR
52	IV	0,41	R	...	
53	II	1,20	R	...	
54	I	3,64	R	...	
55	IV	3,39	R	...	
57	III	0,34	R	...	
58	IV	0,20	NR	0,20	NR
59	III	0,57	R	...	
61	IV	0,24	R	...	
62	I	0,36	R	...	

R= reagente NR= não reagente ... = amostra não ensaiada

Legenda Classificação:

Tipo I: quando não há alterações no exame de imagem

Tipo II: quando aparecem cistos íntegros, sem sinais de edema ou processo inflamatório

Tipo III: são visualizados cistos associados a processo inflamatório e/ou em degeneração

Tipo IV: quando há apenas calcificações nodulares

Forma Mista: quando há dois ou mais tipos de imagens

Ventricular: é analisado separadamente, podendo estar associado a qualquer dos tipos descritos

.....: exame de imagem não obtido

ANEXO VII:**RESULTADOS GERAIS AMOSTRAS DO GRUPO DE OUTRAS
PATOLOGIAS (ESQUISTOSSOMOSE E NEUROSSÍFILIS) EM ELISA**

Antígeno	<i>T. solium</i>	Resultado	LV-Tcra	Resultado	ConA-Tcra	Resultado	GP-Tcra	Resultado
Teste	ELISA IgG		ELISA IgG		ELISA IgG		ELISA IgG	
Cut-Off	1,2		0,23		0,22		0,21	
	Índice		D.O.		D.O.		D.O.	
Amostra								
NS1	0,37	NR	0,14	NR	0,17	NR	...	
NS2	0,49	NR	0,11	NR	0,15	NR	...	
NS3	1,76	R	0,80	R	1,56	R	0,53	R
NS4	0,77	NR	0,17	NR	0,28	R	0,19	NR
NS5	0,10	NR	0,35	R	0,34	R	0,27	R
NS6	0,34	NR	0,09	NR	0,13	NR	...	
ESQ1	0,39	NR	0,21	NR	0,15	NR	...	
ESQ2	0,38	NR	0,18	NR	0,18	NR	...	
ESQ3	0,38	NR	0,17	NR	0,20	NR	...	
ESQ4	0,30	NR	0,10	NR	0,12	NR	...	
ESQ5	0,44	NR	0,45	R	0,51	R	0,21	R
ESQ6	0,67	NR	0,31	R	0,50	R	0,55	R
ESQ7	0,54	NR	0,28	R	0,24	R	Mi	

NR= não reagente

R= reagente

... = amostra não ensaiada

Mi= material insuficiente

ANEXO VIII:**RESULTADOS DOS ELISA PARA ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE
COM ANTÍGENO ConA-Tcra E LV-Tcra**

Resultados de seis ensaios de ELISA com amostras de LCR “pool” positivo e negativo com média, desvio padrão, coeficiente de variação e limite para o antígeno Líquido vesicular de *T. crassiceps*.

Diluição	1	2	3	4	5	6	Média	Desvio Padrão
1:2	3,69	3,86	3,44	3,40	3,72	3,65	3,62	0,17
1:4	3,81	3,77	3,42	3,36	3,60	3,56	3,58	0,18
1:8	3,75	3,49	3,39	3,27	3,45	...	3,47	0,18
1:16	3,40	3,09	3,22	2,88	3,09	...	3,14	0,19
1:32	...	2,12	2,47	2,31	2,61	2,50	2,40	0,19
1:64	2,07	1,38	1,68	1,68	1,83	1,70	1,72	0,23
1:128		0,80	0,86	0,79	1,08	0,82	0,87	0,12
1:256	0,66	...	0,62	0,59	0,63	0,60	0,62	0,03
1:512	0,40	0,29	0,20	0,28	0,37	0,25	0,30	0,07
1:1024	0,24	0,20	0,20	0,19	0,24	0,21	0,21	0,02
Pool-								
1:2	0,18	0,14	0,12	0,12	0,10	0,10	0,13	0,02

...: dados não obtidos

Diluição Pool+	Coeficiente de Variação	Limite
1:2	4,6	3,96 – 3,28
1:4	5,02	3,94 – 3,22
1:8	5,18	3,83 – 3,11
1:16	6,05	3,25 – 2,76
1:32	7,91	2,78 – 2,02
1:64	13,37	2,18 – 1,26
1:128	13,79	1,11 – 0,63
1:256	4,83	0,68 – 0,56
1:512	23,33	0,44 – 0,16
1:1024	9,52	0,25 – 0,17
Pool -		
1:2	23,07	0,19 – 0,19

Resultados de nove ensaios ELISA com amostras de LCR “pool” positivo e negativo com média, desvio padrão, coeficiente de variação e limite para o antígeno Concanavalina A de *T. crassiceps*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Média	Desvio Padrão
1:2	3,58	3,40	3,63	3,76	3,71	3,54	3,64	3,55	3,23	3,56	0,16
1:4	3,30	2,84	3,61	3,87	3,62	3,30	3,53	3,37	2,68	3,35	0,38
1:8	2,73	2,51	3,17	3,52	3,20	2,69	2,96	2,85	1,95	2,84	0,45
1:16	2,03	1,73	2,32	2,99	2,42	1,86	2,30	2,27	...	2,24	0,39
1:32	1,36	1,22	1,54	...	1,68	1,17	1,52	1,56	...	1,44	0,19
1:64	0,85	0,73	0,95	...	...	0,62	0,78	0,87	0,58	0,77	0,13
1:128	0,52	0,44	0,42	...	...	0,33	0,59	0,57	0,32	0,45	0,11
1:256	0,32	0,27	0,32	...	0,41	0,27	0,35	0,35	0,26	0,32	0,05
1:512	0,20	0,19	0,21	0,36	0,29	0,18	0,24	0,25	0,15	0,23	0,06
1:1024	0,14	0,14	0,12	0,26	0,22	0,16	0,18	0,17	0,11	0,17	0,05
Pool-											
1:2	0,18	0,11	0,17	0,21	0,21	0,22	0,18	0,16	0,10	0,17	0,04

...: dados não obtidos

Diluição Pool+	Coeficiente de Variação	Limite
1:2	4,5	3,88 – 3,24
1:4	11,3	4,71 – 2,59
1:8	15,9	3,74 – 1,94
1:16	17,4	3,02 – 1,46
1:32	13,2	1,82 – 1,06
1:64	16,9	1,03 – 0,51
1:128	24,5	0,67 – 0,23
1:256	15,6	0,42 – 0,22
1:512	26,0	0,35 – 0,11
1:1024	29,4	0,27 – 0,07
Pool -		
1:2	23,5	0,25 – 0,09