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

**Neurocisticercose Humana: Pesquisa de Antígenos em Amostras de
Líquido Cefalorraquiano**

Alessandra Xavier Pardini

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Prof^a. Associada Adelaide José Vaz

São Paulo
2004

Ficha Catalográfica

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

Pardini, Alessandra Xavier
P226n Neurocisticercose humana : pesquisa de antígenos em
amostras de líquido cefalorraquiano / Alessandra Xavier
Pardini. -- São Paulo, 2004.
132p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Vaz, Adelaide José

1. Neurocisticercose 2. Teste imunoenzimático : Elisa :
Medicina 3. Líquido cefalorraquiano : Análise clínica : Medicina
I. T. II. Vaz, Adelaide José, orientador.

616.85 CDD

Alessandra Xavier Pardini

Neurocisticercose Humana: Pesquisa de Antígenos em Amostras de
Líquido Cefalorraquiano

Comissão Julgadora

Prof^a. Associada Adelaide José Vaz
Orientador/Presidente

Dr. Luis dos Ramos Machado
1^o Examinador

Dr. José Antonio Livramento
2^o Examinador

Dr. Sandro Rogerio de Almeida
3^o Examinador

Dr^a. Kioko Takei
4^o Examinador

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
1 – Parasitas e Extratos Antigênicos	17
2 – Caracterização dos Antígenos de LV-Tcra, T-Tso e ES-Tcra	19
3 – Obtenção e fracionamento dos soros imunes	21
4 – Obtenção do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra	25
5 – Amostras de líquido cefalorraquiano	29
6 – Pesquisa de antígenos em amostras de líquido cefalorraquiano	31
7 – Caracterização dos antígenos detectados nas amostras de líquido cefalorraquiano	35
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	74
CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXOS	112

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por
terem permitido que tudo acontecesse

A querida Adelaide minha eterna admiração e agradecimento pela
dedicação, carinho, paciência,
respeito e incentivo me dados em todas as horas da realização destes trabalho

Aos pais Euclides e Isis pelo carinho, amor e incentivo

Aos meus irmãos Junior, Carla e Aurélio, pelo carinho

Ao meu afilhado Neto pelo amor e sorriso de todas as horas

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Apoio Financeiro: FAPESP, processos 1998 – 04473-9 e 2002 – 012061-0.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Associada Adelaide José Vaz, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo seu exemplo de trabalho, dedicação, respeito, carinho e incentivo em todas as horas da realização deste trabalho.

A Banca do Exame Geral de Qualificação Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira, Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, Prof. Dr. Luís dos Ramos Machado, Profa. Dr^a. Sumie H. Shimizu, pelas críticas e sugestões.

A Prof^a. Dr^a. Kioko Takei, pelo carinho e incentivo.

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. Luís dos Ramos Machado, Dr. José Antônio Livramento e Dr. Oswaldo M. Takayanagui, pelas amostras de LCR gentilmente cedidas.

Ao Dr. José Mauro Peralta e Dr^a. Regina Helena Peralta da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas críticas e sugestões.

A Dr^a. Noeli Maria Espíndola, pelos anticorpos monoclonais gentilmente cedidos.

A Dr^a. Katya C. Rocha da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas Oswaldo Cruz pelos antígenos de *Cryptococcus*.

Ao Dr. A. M. Maia da Faculdade de Zootecnia da Universidade do Estado de São Paulo, em Pirassununga, SP.

Ao pesquisador Paulo Mutuko Nakamura, do setor de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo incentivo e apoio.

Aos colegas Noeli, Alberto, Marcinha, Déia, Paulinha, Cris, Eloi, Fernando, Gustavo, Mariana, Edward, Tadeu, Eliane, Silene e Sandra, pelo carinho, convívio e companheirismo recebido no Laboratório de Imunologia Clínica.

A querida Noeli, amiga de todas horas.

Ao querido Alberto, amigo de todas as horas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu eterno agradecimento.

Resumo

Neurocisticercose Humana: Pesquisa de Antígenos em Amostras de Líquido Cefalorraquiano

A detecção de antígenos em amostras de líquido cefalorraquiano (LCR) de pacientes com neurocisticercose (NC) foi realizada empregando-se o teste ELISA com soros policlonais de coelhos imunizados com os antígenos total de *Taenia solium* (T-Tso), líquido vesicular de *Taenia crassiceps* (LV-Tcra) e peptídeos <30kDa de LV-Tcra. Os soros policlonais foram fracionados para a obtenção da fração IgG – IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa. Também foi empregado o anticorpo monoclonal específico para o antígeno de excreção e secreção de *Taenia crassiceps* (ES-Tcra). A seleção dos clones foi realizada por ELISA empregando-se os antígenos T-Tso e LV-Tcra.

Foram analisados diferentes grupos de amostras divididos em: grupo de pacientes com NC (grupo NC), incluindo pacientes em diferentes fases evolutivas da doença, grupo de pacientes “suspeito” de NC (grupo “suspeito” NC), grupo controle (grupo C) e grupo de outras patologias (grupo OP).

No teste ELISA empregando-se as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa, a sensibilidade obtida foi de 70%, 82,5% e 95,8% e a especificidade de 82,5%, 98% e 100%, respectivamente nas amostras do grupo NC e grupo C. Nas amostras do grupo diferentes fases evolutivas da doença, não houve diferença significativa de reatividade entre as amostras com as frações empregadas.

Para as 21 amostras do grupo NC - fase ativa da doença, com a fração IgG anti-Tcra e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, respectivamente, 13 e 16 amostras foram positivas para a pesquisa de antígenos. As amostras de LCR do grupo C não apresentaram reatividade com os anticorpos empregados nos ensaios.

Também foram ensaiadas 68 amostras de LCR de pacientes com “suspeita” de NC. De acordo com as características citoprotéicas além da reatividade para a pesquisa de anticorpos anti-*T. solium*, as amostras de

LCR apresentaram, neste grupo, padrão de reatividade para a pesquisa de antígenos que variou também de acordo com a presença de anticorpos, além das alterações de proteína e/ou células, que as amostras apresentavam ou não.

Frações de 14 e 18kDa foram identificadas pelo teste imunoblot somente nas amostras de LCR de pacientes com NC utilizando as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra.

O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra mostrou-se eficiente para a pesquisa de antígenos no teste de competição por ELISA nas amostras de LCR de pacientes com NC e o antígeno ES-Tcra.

Abstract

Antigen detection in cerebrospinal fluid (CSF) samples of patients with neurocysticercosis (NC) was performed through ELISA test using rabbits polyclonal sera immune with total antigens of *Taenia solium* (T-Tso) cysticercus, vesicular liquid of *Taenia crassiceps* (VL-Tcra) and vesicular liquid peptides (VLP-Tcra<30kDa) cysticercus. The polyclonal sera were separated obtaining IgG-IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra and IgG anti-Tcra <30kDa fractions. A specific monoclonal antibody was also applied for reaching the excretion and secretion antigen of the *T. crassiceps* (ES-Tcra) larvae culture. Clones selection was performed through Elisa test applying the T-Tso and VL-Tcra antigens.

When IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra and IgG anti-Tcra<30kDa fractions were applied in the ELISA test, the accuracy obtained was 70%, 82,5% and 95,8% and the specificity of 82,5%, 98% and 100%, respectively, in samples of both NC and C groups. In the samples of the group in different stages of the disease there was no significant difference on reactivity between the samples when the fractions were applied.

For the 21 samples of the NC group – active stage of the disease with IgG anti-Tcra fraction and the anti-ES-Tcra monoclonal antibody respectively, 13 and 16 samples were positive for antigen analyses. The CSF samples of the C group did not present reactivity with the antibodies applied in the tests.

Tests for 68 CSF samples of “suspected” NC group, were also conducted. According to the cytoproteic characteristics besides the reactivity for the anti-*T. solium* antibody study, the CSF samples of this group showed standard reactivity for antigen detection ranging also in accordance with the presence of antibodies and of the protein and/or cell alterations that the samples would or not present.

Fractions of 14 and 18kDa were identified by immunoblot test only in the CSF samples of patients with NC using the IgG anti-Tso IgG anti-Tcra fractions and the anti-ES-Tcra monoclonal antibody.

The anti-ES-Tcra monoclonal antibody has shown to be efficient for analyzing antigens by a comparing method of the ELISA test in CSF samples of patients with NC and the ES-Tcra antigen.

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1: Volume, concentração ([]) protéica, quantidade total de proteína obtida de cada antígeno - LV-Tcra e T-Tso.

Tabela 2: Resultados de teste ELISA em porcentagem (%) para pesquisa de antígenos de amostras de LCR de pacientes do grupo Neurocisticercose; para as 39 amostras de LCR de pacientes com resultados de imagem classificadas de acordo com Machado et., 1990, ensaiadas com a fração IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra; vinte e uma amostras de LCR de pacientes em fase ativa da doença e 68 amostras de LCR de pacientes do grupo “suspeito” Neurocisticercose ensaiadas com a fração IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra.

Figura 1: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% e coloração pelo Coomassie Blue, dos extratos antígenicos total de *Taenia solium* (A), líquido vesicular de *Taenia crassiceps* (B) e ES-Tcra (C) corado pelo nitrato de prata. À esquerda padrão de peso molecular em kDa (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4).

Figura 2: Resultados de ELISA (absorbância) de soro controle, anti-Tso, anti-Tcra e anti-Tcra<30kDa com o extrato antígeno total de *T. solium*.

Figura 3: Resultados de ELISA (absorbância) de soro controle, anti-Tso, anti-Tcra e anti-Tcra<30kDa com o extrato antígeno líquido vesicular de *T. crassiceps*.

Figuras 4A e 4B: Resultados de ELISA – reatividade homóloga (4A) com antígeno total de *T. solium* e heteróloga (4B) com antígeno líquido vesicular de *T. crassiceps* e soro controle e fração IgG anti-Tso diluída a 1:100, 1:500, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000. Os antígenos foram utilizados na concentração protéica de 1µg/100µL.

Figuras 5A e 5B: Resultados de ELISA – reatividade homóloga (5B) com antígeno líquido vesicular de *T. crassiceps* e heteróloga (5A) com antígeno total de *T. solium* e soro controle e fração IgG anti-Tcra diluída a 1:100, 1:500, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000. Os antígenos foram utilizados na concentração protéica de 1µg/100µL.

Figuras 6A e 6B: Resultados de ELISA – reatividade homóloga (6B) e heteróloga (6A) de soro controle e fração IgG anti-Tcra<30kDa diluída a 1:100, 1:500, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000 com extrato antígeno total de *T. solium* (6A) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (6B), ambos na concentração protéica de 1µg/100µL.

Figuras 7A e 7B: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade homóloga (7A) e heteróloga (7B) do soro controle e da fração IgG anti-Tso diluídos a 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1.000 ensaiados com extrato antigênico total de *T. solium* (7A) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (7B) em concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

Figuras 8A e 8B: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade heteróloga (8A) e homóloga (8B) do soro controle e da fração IgG anti-Tcra diluídos a 1:100, 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 ensaiados com extrato antigênico total de *T. solium* (8A) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (8B) em concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

Figuras 9A e 9B: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade heteróloga (9A) e homóloga (9B) do soro controle e da fração IgG anti-Tcra<30kDa diluídos a 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1.000 ensaiados com extrato antigênico total de *T. solium* (9A) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (9B) em concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

Figuras 10A e 10B: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade heteróloga (10A) e homóloga (10B) do soro controle e do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra diluídos a 1:50 e 1:100 ensaiado com extrato antigênico total de *T. solium* (10A) e diluído a 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 ensaiado com o extrato antigênico líquido vesicular de *T. crassiceps* (10B), ambos em concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

Figura 11: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade homóloga do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotilado diluído a 1:1.000 ensaiado com extrato antigênico total de líquido vesicular e de excreção/secreção de *T.* ambos em concentração protéica variando de 1µg – 1ng/100µL.

concentração de 50ng e o anticorpo monoclonal biotilado na diluição de 1:1.000 e as amostras de LCR de pacientes com NC.

Figura 12: Imunoblot de soros controle reação (soro antes da imunização) (tiras CR) e controle branco (tiras CB) e da fração IgG anti-Tso (tira 1), IgG anti-Tcra (tira 2) e IgG anti-Tcra<30kDa (tira 3) frente ao extrato antigênico total de *T. solium* (A) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (B). À esquerda e ao centro padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

Figura 13: Imunoblot do soro controle (**tiras 1**) e do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra (**tira 2**) frente ao extrato antigênico total de *T. solium* (**A**) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (**B**). As setas indicam os peptídeos de 18 e 14kDa. À esquerda e ao centro padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

Figura 14: Valores de índice de reatividade de ELISA para a detecção de antígenos em 64 amostras de LCR de pacientes do Grupo Neurocisticercose e 50 amostras do Grupo Controle ensaiadas com as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa. O *cut-off* (-) da reação é indicado na figura.

Figura 15: Valores de índice de reatividade de ELISA para a detecção de antígenos em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose em diferentes fases evolutivas da doença – tipo III, IV e misto (segundo MACHADO et al., 1990) ensaiadas com as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra. O *cut-off* (-) da reação é indicado na figura.

Figura 16: Valores de índice de reatividade de ELISA para a detecção de antígenos em 22 amostras de LCR de pacientes do Grupo Controle (**Grupo C**); em 21 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose em fase ativa da doença (**Fase Ativa**); em 68 amostras de LCR de pacientes do Grupo “Suspeito” Neurocisticercose (LCR citoprotéico “Normal” ou Alterado com pesquisa de anticorpo anti-*T. solium* com resultado negativo/inconclusivo ou positivo); e em 17 amostras de LCR de pacientes do Grupo Outras Patologias (**Grupo OP**) ensaiadas ensaiadas com a fração IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. O *cut-off* (-) da reação é indicado na figura.

Figura 17: Resultados de ELISA competição com oito amostras de LCR de pacientes com NC e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado/avidina-peroxidase. A placa de ELISA foi sensibilizada com o antígeno ES-Tcra na concentração de 50ng/100µL, e após incubação prévia foi adicionado 50µL de LCR e 50µL de anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra marcado diluído a 1:1.000.

Figura 18: Resultados de ELISA competição com a fração IgG anti-Tcra. O antígeno LV-Tcra foi utilizado na concentração de 0,1µg/100µL e a competição foi realizada entre o antígeno LV-Tcra nas concentrações (µg/100µL) – 1,0; 0,1; 0,5; 0,01; 0,005; 0,001, juntamente com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra diluído a 1:1.000.

Figura 19: Resultados de ELISA sanduíche com a fração IgG anti-Tcra diluída a 1:500 adsorvida a placa e o antígeno LV-Tcra diluído em diferentes concentrações ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$) – 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0,001. Como conjugado foi utilizado anti-IgG de camundongo absorvido a 1:2 com IgG de coelho.

Figura 20: Imunoblot dos antígenos T-Tso (A) e LV-Tcra (B) como controle negativo (tira 1), com a fração de IgG anti-Tso (tira 2) e fração IgG anti-Tcra (tira 3). Duas amostras do grupo Neurocisticercose (tiras 4 e 5) e duas amostras do grupo Controle (tiras 6 e 7) foram ensaiadas com a fração IgG anti-Tso (C) e fração IgG anti-Tcra (D). À esquerda e ao centro padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa). As setas indicam os peptídeos de 14 e 18kDa.

Figura 21: Imunoblot de vinte amostras de LCR de pacientes com NC em fase ativa da doença (C) utilizando a fração IgG anti-Tcra (I) e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra (II). Controles: antígenos T-Tso (A) e LV-Tcra (B), tira CB controle branco, tira C+ controle positivo, com a fração de IgG anti-Tcra (I) e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra (II). À esquerda e ao centro padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

Figura 22: Blot de três "pool" (P1, P2, P3) de LCR de pacientes com NC em fase ativa utilizando como conjugado anti-IgG humano marcado com biotina/avidina-peroxidase (A) e anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina (B). Controle tiras de antígeno LV-Tcra (C). À esquerda padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

Figura 23: Imunoblot do antígeno LV-Tcra purificado com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e separado em SDS-PAGE em diferentes concentrações: 0,1 μg (tira 1), 20 ng (tira 2), 10 ng (tira 3), 5 ng (tira 4) 1 ng (tira 5) ensaiadas como anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina. À esquerda padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

Figura 24: Imunoblot do antígeno LV-Tcra purificado com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e separado em SDS-PAGE em diferentes concentrações: 50 ng (tira 1), 10 ng (tira 2), 5 ng (tira 3) e 1 ng (tira 4) ensaiadas como anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado/avidina-peroxidase e a reação foi revelada por quimioluminescência. À esquerda padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

INTRODUÇÃO

A cisticercose é provocada pela presença da larva *Taenia solium* (*T. solium*) nos tecidos de seu hospedeiro intermediário (suíno), enquanto que a teníase é provocada pela presença da forma adulta da *T. solium* no intestino delgado do humano. São doenças conhecidas desde a antiguidade, pensando-se por muito tempo que eram causadas por fenômenos ou espécies diferentes. Daí os nomes específicos para a forma adulta e forma larvária (NEVES, 2000).

Causada pela forma larvária da *T. solium* no sistema nervoso central (SNC), a neurocisticercose (NC) representa importante problema de Saúde Pública com reflexos sócio-econômicos (CANTÚ & BARINAGARRAMENTARIA, 1996; CHUNG et al., 2002; FLISSER et al., 2003; SARTI & RAJSHEKHAR, 2003). É considerada uma doença endêmica em regiões carentes como América Latina, Ásia, África, China, Indonésia e preocupa autoridades em países em desenvolvimento (McMANUS, 1990; VALDEZ et al., 1994; MONTENEGRO et al., 1996; WHITE, 1997; HUBERT et al., 1999; MARGONO et al., 2001; JOSHI et al., 2001; FLISSER et al., 2003; SARTI et al., 2003), provocando elevado número de casos de epilepsia (ROMÁN et al., 2000). A imigração e o turismo tem contribuído para o surgimento de casos de NC na Austrália, Europa e América do Norte (ROMÁN et al., 2000). Recentes levantamentos epidemiológicos demonstraram que a NC é uma doença emergente em países desenvolvidos como os Estados Unidos (GARCIA et al., 1997; SCIUTTO et al., 2000; FLISSER et al., 2003). Em recente estudo, foi demonstrado que em 11 estados americanos com população hispânica, como na Califórnia e no Texas, a NC é responsável pelo aumento de 10% de casos de epilepsia indefinidos encontrados no hospital de emergência (SCHANTZ & TSANG, 2003). O aumento do número de casos de NC nesses países pode ser associado a imigrantes de áreas contaminadas da América Latina (ESTRADA et al., 1989; GARCIA et al., 2002a; CARPIO, 2002; ITO et al., 2003; GARCIA et al., 2003).

Estima-se que a NC cause anualmente a morte de 50.000 pessoas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, foi proposto que a NC deva ser declarada uma doença mundial. Novos casos de NC vem sendo relatados por clínicos e em hospitais. Acredita-se que a notificação compulsória seja a melhor forma de se quantificar a incidência e a prevalência da NC, e que permitirá o emprego de recursos para a sua erradicação (ROMÁN et al., 2000).

Em recente estudo, o “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), declarou a importância do controle de doenças infecciosas em todo o mundo, sendo assim uma das formas de prevenção e controle da cisticercose nos Estados Unidos, com o suporte e colaboração no diagnóstico, levantamento, aplicação de programas de saúde para o controle das áreas endêmicas dada pela “Division of Parasitic Diseases” (NCID/CDC) e “WHO/CDC Collaborating Center for Cysticercosis and Taeniasis” (SCHANTZ & TSANG, 2003).

ASPECTOS GERAIS

O gênero *Taenia* pertence à família *Taeniidae* (da classe *Cestoidea* e da ordem *Cyclophyllidea*), que se caracteriza por ausência completa do aparelho digestivo, segmentação do corpo em proglotes, dotadas cada qual de um sistema reprodutor hermafrodita; presença de quatro ventosas no escólex; úteros em forma de tubos longitudinais ramificados, testículos numerosos e poros genitais situados nas margens das proglotes com disposição irregularmente alternada (REY, 2001).

A *T. solium*, na fase adulta, tem como único hospedeiro o homem, e doença que produz chama-se teníase. Ainda que o homem não seja um hospedeiro normal das larvas (por não assegurar o futuro da evolução), pode infectar-se pelos ovos de *T. solium*, apresentando em consequência os quadros clínicos da cisticercose, que constitui a forma mais grave de parasitismo humano por helmintos devido às localizações preferenciais dos cisticercos no sistema nervoso e globo ocular (REY, 2001).

O homem, responsável pela manutenção do ciclo parasitário, elimina ovos ou até mesmo proglotes inteiras nas fezes. O suíno ingerindo ovos viáveis do parasita, irá propiciar condições ideais para que o embrião hexacanto, ou oncosfera, se desenvolva em seus tecidos até a forma larvária da *T. solium*. A teníase humana ocorre quando a carne de porco é consumida crua ou insuficientemente cozida (VAZ & LIVRAMENTO, 1996; REY, 2001).

A cisticercose humana é o resultado da presença de formas larvárias da *T. solium* – cisticercos, parasitando tecidos do homem. A contaminação decorre da ingestão accidental dos ovos do parasito, pela água ou por alimentos contaminados. A forma mais grave da infecção humana decorre da localização de cisticercos no sistema nervoso central (SNC), NC, com graves sintomas (VAZ & LIVRAMENTO, 1996; REY, 2001). Conforme a localização dos parasitos, em diferentes órgãos, mas principalmente no SNC e no globo ocular, a cisticercose pode adquirir o caráter de doença crônica grave, por suas manifestações, seqüelas ou alta letalidade (REY, 2001).

Para o controle da NC são de extrema importância cuidados com saneamento básico, controle de água, educação sanitária e inspeção de carne suína. Entretanto, em países em desenvolvimento, é difícil disponibilizar elementos para a erradicação da teníase-cisticercose. Porém, os gastos para o controle e erradicação da doença são menores do que o tratamento (ROMÁN et al., 2000; CARPIO, 2002).

O tratamento pode ser individualizado de acordo com os sintomas do paciente, empregando-se antiepilépticos, analgésicos, corticosteróides ou a combinação dos mesmos. O emprego rotineiro de drogas anti-parasitárias como o praziquantel e o albendazol vem auxiliado no tratamento da cisticercose (GARCIA et al., 2002b; CARPIO, 2002).

DIAGNÓSTICO

Clínico

A forma mais grave de infecção humana, NC provoca graves sintomas como epilepsia, quadros psíquicos e demenciais e aumento de pressão intracraniana, este último responsável pela elevada letalidade (MACHADO, 1987). 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. Nesta fase, são encontrados anticorpos em elevados níveis no LCR, correspondendo a marcadores de diagnóstico diferencial na vigência de sintomas neurológicos (CARPIO, 2002).

A cisticercose é freqüente causa de desordens neurológicas, e seu diagnóstico de certeza é bastante difícil (GARCIA et al., 1991). O diagnóstico clínico da cisticercose é praticamente impossível de ser feito em assintomáticos, enquanto que nos sintomáticos está sempre associado às alterações patológicas causadas pelos cisticercos. Nos casos de localização no SNC ou em infecções maciças na musculatura esquelética, o diagnóstico radiológico pode auxiliar o clínico, mas tal diagnóstico constitui problema; isto porque os parasitos nem sempre são evidenciáveis, havendo necessidade dos cisticercos estarem calcificados para detecção pelos raios X (NEVES, 2000).

Os exames de imagem, como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética nuclear (RMN) são métodos mais eficientes e são ferramentas importantes para a visualização dos cistos em todas as fases da doença, e também da resposta inflamatória, mas são técnicas muito caras e inacessíveis para a maior parte da população atingida (DIAZ et al., 1992; TSANG & WILSON, 1995; DEL BRUTTO et al., 2001; CARPIO, 2002; DORNY et al., 2003).

No período de elevada hipertensão intracraniana, a visão pode ser afetada. Ocorrem também, com frequência, dor de cabeça súbita, tonturas, vômitos, variações de pulsação e de respiração (NEVES, 2000). Além de epilepsia, a NC pode provocar também aracnoidites, hidrocefalia, perda visual, surtos, demência e outros problemas neurológicos devido a presença dos cisticercos (SOTELO et al., 1985; ROMÁN et al.; 2000; CARPIO, 2002).

Diferentes autores propuseram a classificação dos pacientes com NC. MACHADO et al., 1990, a partir dos resultados de neuroimagem, considerando a relação entre aspectos morfológicos às imagens de TC e RMN (vesículas íntegras, em degeneração e em calcificação ou calcificadas) e a evolução biológica de cada parasita classificaram a NC em: tipo I, quando não há alterações ao exame de imagem; tipo II, quando aparecem cistos íntegros, sem sinais de edema ou processo inflamatório; tipo III, quando são visualizados cistos associados a processo inflamatório e/ou degeneração; tipo IV, quando há apenas calcificações nodulares. Nas formas mistas há dois ou mais tipos de imagens, enquanto que o tipo ventricular é analisado separadamente, podendo estar associado a qualquer dos tipos descritos.

A classificação para a NC pode ser feita de acordo com o estágio biológico do cisto, morfologia, e a resposta inflamatória. Com o emprego da TC e da RMN, a NC foi classificada em forma ativa – com o cisto ativo, forma transitória – com o cisto em degeneração, forma inativa – quando o cisto está calcificado e misto quando são encontradas duas ou mais formas (MOLINARI et al., 2002).

O quadro clínico e a complexidade da interação parasita-hospedeiro dependem da localização, número, tamanho, fase de desenvolvimento e estágio de degeneração dos parasitas, bem como da resposta imune-inflamatória do hospedeiro (MOLINARI et al., 2002).

Imunológico

Os métodos mais usados para se detectar anticorpos anti-cisticercos no soro, líquido cefalorraquiano (LCR) e humor aquoso (ocular) têm sido: reação de fixação do complemento (reação de Weimberg), hemaglutinação indireta, imunofluorescência, e testes imunoenzimáticos (NIETO, 1956; LIVRAMENTO, 1981; NEVES, 2000).

Testes rápidos e simples ainda carecem de melhor padronização e são necessários inclusive para estudos epidemiológicos (ESPINOZA et al., 1986; PAMMENTER & ROSSOUW, 1987; KUNZ et al., 1989; GREENE et al., 1999; ROCHA et al., 2002).

Atualmente, o método mais empregado para a detecção de anticorpos anti-*T. solium* é o teste ELISA, tanto no soro como no LCR. Outro método imunoenzimático que vem sendo utilizado no diagnóstico das cisticercoses humana e suína é o imunoblot (TSANG et al., 1989; MACEDO et al., 2002).

Pesquisa de Anticorpos

Vários métodos imunológicos têm sido utilizados para detectar anticorpos anti-cisticercos no LCR (MOSES, 1911) e no soro, desde a padronização da Reação de Fixação de Complemento. LANGE, 1940, estudando os aspectos bioquímicos, celulares e imunológicos do LCR na NC acrescentou dados importantes para diagnóstico da infecção. 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.

Com o objetivo de melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes imunológicos para o diagnóstico da cisticercose, diferentes autores demonstraram a importância da obtenção de antígenos purificados de *T. solium* especialmente de frações glicoprotéicas do antígeno de *T. solium* para a detecção de anticorpos anti-*T. solium* (TSANG et al., 1989; FELDMAN et al., 1990; PALNCARTE et al., 1994; TSANG & WILSON, 1995;

RODRIGUEZ-CANUL et al., 1997; ITO et al., 1998; PLANCARTE et al., 1999; ITO et al., 1999; RESTREPO et al., 2000).

Vários estudos vêm sendo realizados para a utilização de antígenos glicoprotéicos (GP) de *Taenia solium*, que sejam obtidos de maneira rápida e com técnicas de fácil execução e menor custo. Com o uso de GP em teste imunoblot, baseado na detecção de anticorpos específicos, houve melhora na eficiência diagnóstica. Entretanto, a detecção de anticorpos apresenta duas importantes limitações, primeiro pode indicar somente a exposição à infecção e não necessariamente a presença e estabelecimento da infecção viável, e segundo, os anticorpos podem persistir por longo tempo, mesmo após eliminação do parasita através de mecanismos imunes e/ou por tratamento com drogas (GARCIA et al., 1998).

Pela técnica de coluna de afinidade de lentil-lectina, TSANG et al., 1989, caracterizaram um grupo de 7 GP - 50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13kDa de *Taenia solium*, pelo teste de imunoblot, em que as GP42 e GP24 foram as mais freqüentemente reconhecidas. O teste apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 98%.

Recentes avanços em técnicas sorológicas melhoraram a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico, e os testes sorológicos puderam ser utilizados para estudos epidemiológicos em áreas endêmicas. O teste mais confiável e disponível, é o imunoblot que utiliza antígenos GP de cisticercos de *Taenia solium*, preparados através de procedimento complexo de purificação, através de afinidade por lectina, a partir de cistos intactos. A simplificação no método de preparação das GP reduziram o nível de "back-ground" em testes sorológicos. Considerando mais específicas as frações (pico 19 pH 9,2 e pico 18 pH 9,4), as frações obtidas de cistos intactos ou de líquido vesicular, contém pelo menos três grandes faixas de massa molecular de 10 a 26kDa. Utilizando-se as novas GP foi possível estabelecer um simples método para o diagnóstico sorológico e epidemiológico, monitoramento e prognóstico da NC (ITO et al., 1998).

Entre os diferentes antígenos testados, aqueles ricos em glicoproteínas, obtidos a partir de *T. solium*, são os que têm apresentado maior sensibilidade (MACEDO et al., 2002).

Emprego de Antígeno de *Taenia crassiceps* (antígeno heterólogo)

O estudo de testes imunológicos de aplicação na NC é prejudicado pelas dificuldades de obtenção de parasitas de suínos naturalmente infectados. Por esse motivo, o emprego do antígeno heterólogo de *Taenia crassiceps* (FREEMAN, 1960) vem sendo estudado como fonte alternativa de antígeno. Os cisticercos de *T. crassiceps* podem ser mantidos em peritônio de camundongos e são de fácil obtenção. Essa forma larvária caracteriza-se por reprodução assexuada por meio de brotamentos a partir da membrana e, devido as suas propriedades biológicas, é um importante modelo de laboratório, possibilitando estudos da interação hospedeiro-parasita e dos antígenos para uso em diagnóstico e possível vacinação (LARRALDE et al., 1989; KUNZ et al., LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1992; VAZ, 1993; VAZ et al., 1996; BUENO et al., 2000; ESPÍNDOLA et al., 2002; PARDINI et al., 2002; PERALTA et al., 2002).

A substituição do antígeno de *T. solium* pelo de *T. crassiceps* foi inicialmente avaliada por LARRALDE et al., 1990, mostrando que o antígeno de *T. crassiceps* foi sensível e específico na detecção de anticorpos em amostras de LCR.

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 LCR de pacientes com NC. Pela técnica de imunoblot, foram caracterizados os peptídeos de 72-68kDa e 95-92kDa - imunodominantes no extrato LV-Tcra. Os testes dot-ELISA (VAZ et al., 1996) e hemaglutinação (FERREIRA et al., 1997), foram padronizados com o antígeno heterólogo, com resultados comparáveis ao uso do antígeno homólogo. Os resultados demonstraram que os parasitas compartilham epítomos em comum, presentes em concentração suficiente para serem

usados como fonte em testes imunológicos para detecção de anticorpos em amostras de LCR e soro na NC.

Trabalhos recentes relataram a importância e o potencial do antígeno LV-Tcra. BUENO et al., 2000, demonstraram a especificidade dos peptídeos de 131, 121, 109, 74, e <62 (62, 55, 47, 41, 39, 35, 30, 28, 25, 22, 19-13, e 12kDa) para o antígeno LV-Tcra por imunoblot em amostras de LCR e plasma de pacientes com cisticercose. Os autores ressaltaram a importância da purificação dos peptídeos de <20kDa e de seu emprego em testes ELISA, melhorando a especificidade do teste.

PARDINI et al., 2002, para a pesquisa de anticorpos anti-*T. solium*, empregaram extratos antigênicos de líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) e as frações purificadas por coluna de afinidade com lectina ConA (ConA-Tcra) e glicoprotéico fracionado (GP-Tcra) por eletroforese (SDS-PAGE) fracionado. Para as 29 amostras ensaiadas por ELISA, todas apresentaram reatividade com os antígenos LV-Tcra e ConA-Tcra. Quinze amostras também foram ensaiadas com o antígeno GP-Tcra e todas foram reagentes. A sensibilidade e a especificidade obtidas para todos os antígenos foi de 100% no teste ELISA, com boa reprodutibilidade. Por imunoblot, para os três antígenos foram caracterizados os peptídeos de baixo peso molecular (18 e 14kDa) somente nas amostras de LCR de pacientes com cisticercose. Os resultados confirmaram que os antígenos de *T. crassiceps* são uma importante fonte alternativa de extratos antigênicos para a detecção de anticorpos em amostras de LCR de pacientes com cisticercose.

PERALTA et al., 2002, empregando o antígeno total de *T. solium* pela técnica de ELISA e por imunoblot com o antígeno glicoprotéico de *T. crassiceps* ensaiaram 64 amostras de LCR e soro de pacientes com neurocisticercose. Trinta e cinco amostras de soro também foram ensaiadas por imunoblot com o antígeno glicoprotéico de *T. solium* e 30 amostras foram ensaiadas com o antígeno glicoprotéico de 14kDa de *T. crassiceps*. Para o ELISA empregando o antígeno glicoprotéico de *T. crassiceps* 23 (77%) das amostras de soro apresentaram reatividade, além da positividade

para 22 amostras de LCR; e as amostras do grupo controle foram negativas, uma amostra de soro com *T. saginata* foi reagente neste ensaio, mostrando especificidade de 99%. Os autores sugerem que a fração purificada de 14kDa do antígeno de *T. crassiceps* possa ser empregada para a detecção de anticorpos anti-*T. solium* em amostras de soro em levantamentos soropidemiológicos e também para a triagem de pacientes com cisticercose.

Detecção de Antígenos

A detecção de antígenos liberados pelo parasita poderá ser útil, pois ampliaria as perspectivas de diagnóstico, uma vez que os antígenos, principalmente de excreção e secreção, apareceriam antes da produção de anticorpos. A pesquisa de antígenos também pode ser útil em estudos de imunogenicidade além de contribuir para elucidar mecanismos patogênicos e para obtenção de antígenos para uso diagnóstico e em imunização. Entretanto, as técnicas para a detecção de antígenos requerem melhor avaliação e ainda não estão disponíveis na rotina laboratorial (VELASCO-CASTREJÓN et al., 1989, ESTRADA et al., 1989; TELLEZ-GIRON et al., 1987; TELLEZ-GIRON et al., 1989; CHOROMANSKI et al., 1990; SAKO & ITO, 2001; PARDINI et al., 2001; ESPÍNDOLA et al., 2002) .

Diferentes técnicas têm sido descritas para a detecção de antígenos em amostras de pacientes com cisticercose humana, tais como aglutinação em látex, HPLC, imunoblot e ELISA, utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais.

VELASCO-CASTREJÓN et al., 1983, detectaram antígenos de *T. solium* em 88% de 189/215 amostras de LCR de pacientes com NC utilizando aglutinação de partículas de látex adsorvidas com soro de coelho imune anti-líquido vesicular, anti-excreção/secreção e anti-extrato total de cisticercos de *T. solium*.

Com a técnica de imunoblot, ESTRADA et al., 1989, identificaram os peptídeos de 190 e 230kDa, em 14 de 18 amostras de LCR de pacientes

com suspeita de NC, empregando soro policlonal de coelho anti-*T. solium* e “pool” de soro de pacientes com NC. Os antígenos identificados nas amostras de LCR corresponderam aos antígenos com mesmo peso molecular detectados no líquido vesicular do cisto.

Empregando as técnicas de dot-ELISA e ELISA, TELLEZ-GIRON et al., 1987 e 1989, utilizando IgG purificada de soro policlonal de coelho imunizado com antígeno de *T. solium*, detectaram antígenos em amostras de LCR de pacientes com NC. Com o teste dot-ELISA 10 de 17 (59%) amostras de LCR de pacientes continham antígenos, enquanto que por ELISA 13 de 17 (77%) amostras apresentaram reatividade. A especificidade para ambos os métodos foi de 100%, quando ensaiadas com 48 amostras de pacientes com outras desordens neurológicas. Com o teste imunoblot, os autores identificaram uma proteína circulante de 66kDa nas amostras de LCR de pacientes com NC.

Usando o anticorpo monoclonal anti-*T. saginata* no teste ELISA, vários autores estudaram a pesquisa de antígenos em diferentes grupos de pacientes (CORREA et al., 1989; CORREA et al., 1999; GARCIA et al., 2000; GARCIA et al., 2000a; GARCIA et al., 2000b; GARCIA et al., 2002; ERHART et al., 2002; ZOLI et al., 2003)

Para o estudo da cisticercose humana e suína, CORREA et al., 1989, empregaram anticorpos monoclonal anti-*T. saginata* (HP10) e policlonal obtidos de suínos imunizados com antígeno B de cisticercos, para detecção de produtos do parasita por ELISA. Para as amostras de soro de suínos com cisticercose, o anticorpo monoclonal apresentou 79% de sensibilidade. Com a combinação de anticorpos monoclonal e policlonal a sensibilidade para a detecção de antígenos em 31 amostras de LCR por ELISA chegou a 93%. Os autores não relatam estudos de reatividade-cruzada com outras parasitoses.

Empregando a técnica de HPLC para o fracionamento de amostras de LCR de pacientes com suspeita de NC, antígenos larvais foram detectados em 44 das 79 amostras de LCR, apresentando uma fração de aproximadamente 110kDa (pico 2), caracterizado pela técnica de imunoblot.

Em 23 destas 44 amostras também foram detectados antígenos no pico 1 (>400kDa) (CHOROMANSKI et al., 1990).

Anticorpos monoclonais também foram avaliados por CHANG-YUAN et al., 1992, por teste ELISA na detecção de antígenos circulantes em 116 amostras de LCR de pacientes com NC. Antígenos foram detectados em 95 (81,9%) das 116 amostras ensaiadas. O teste não apresentou reatividade cruzada no ensaio de 40 amostras de LCR de pacientes com outras desordens neurológicas, apresentando 100% de especificidade.

Em levantamento soroepidemiológico, CORREA et al., 1999, compararam a técnica de pesquisa de antígenos e anticorpos em amostras de soro de pacientes com epilepsia ou teníase em área endêmica de cisticercose, no México. Foi evidenciado forte associação a presença de antígenos e anticorpos nas amostras de pacientes com epilepsia, no entanto, a detecção de antígenos parece estar associada à crises epilépticas tardias enquanto que a presença dos anticorpos foi associada aos nódulos subcutâneos. O teste para a detecção de antígenos mostrou-se menos sensível porém, mais específico que o teste para a detecção de anticorpo, tanto para os casos de teníase como para os casos de epilepsia.

GARCIA et al., 2000, verificam a eficácia do tratamento com albendazol utilizando a pesquisa de antígenos em amostras de soro de 46 pacientes com NC por teste ELISA com anticorpo monoclonal anti-cisticerco de *T. saginata* (HARRISON et al., 1989). O teste apresentou sensibilidade de 85% (39/46), e nos pacientes com apenas um cisto viável ou com lesões (cistos em degeneração) não apresentaram reatividade. A especificidade do teste foi de 92% (23/25) quando ensaiado em amostras do grupo controle. O tratamento com albendazol reduziu os níveis de antígenos após 3 meses nos pacientes que apresentaram morte parasitária após o tratamento. Posteriormente, o grupo de autores investigaram a detecção de antígenos em amostras de pacientes com hidrocefalia provocada pela cisticercose. As amostras foram ensaiadas por ELISA com anticorpo monoclonal anti-*T. saginata* (HP10). Das 56 amostras de soro de pacientes com cisticercose, 27 apresentavam cistos calcificados e 29 apresentavam hidrocefalia. Os

resultados demonstraram que houve detecção de antígenos em 14 das 29 amostras de LCR dos pacientes com hidrocefalia (GARCIA et al., 2002).

Devido a suspeita de casos de cisticercose em Hanoi, Viet Nam, foi proposto a pesquisa de antígenos por ELISA em amostras de soro de pacientes com crise epiléptica tardia ou com nódulos subcutâneos, confirmados por técnicas de imagem ou biópsia. Das 36 amostras de soro avaliadas, 34 apresentaram positividade (94,4%), resultados confirmados por TC, biópsia ou nódulos subcutâneos. O teste também não apresentou reatividade cruzada com amostras de outras parasitoses (ERHART et al., 2002).

Em recente estudo, ZOLI et al., 2003, analisaram 7 amostras de soro de pacientes em fase ativa da cisticercose, tratados durante 8 dias com albendazol.

Também em veterinária, as técnicas para a detecção de antígenos de secreção/excreção poderá proporcionar melhor correlação com a presença de parasitas viáveis, já que pela pesquisa de anticorpos não é possível fazer a distinção entre cistos viáveis e não viáveis, além de apresentar-se como outra alternativa no controle à inspeção da carne em abatedouros (FLISSER et al., 1989; RODRIGUEZ-del-ROSAL et al., 1989; BRANDT et al., 1992; DRAELANTS et al., 1995a; ONYONGO-ABUJE et al., 1996; FAN et al., 1997).

Para o estudo da cisticercose suína, RODRIGUEZ-del-ROSAL et al., 1989, pela técnica de ELISA detectaram antígenos em amostras de soro de suínos com aplicação de anticorpos monoclonais de *T. solium* e anti-*T. saginata* (HP10). O monoclonal HP10 mostrou-se mais eficiente para a detecção de antígenos nas amostras de soro de suínos tratados 26/33 (79%) antes do tratamento e 30/33 (91%) após o tratamento, e especificidade de 97%.

Com a produção de um anticorpo monoclonal de *T. saginata* HARRISON et al., 1989, detectaram antígenos glicoprotéicos em amostras de soro de gado infectado com diferentes quantidades de ovos por *T.*

saginata. Os autores relatam que o anticorpo monoclonal HP10 é específico para a detecção de antígenos de *T. saginata* e *T. solium*.

BRANDT et al., 1992, obtiveram dois anticorpos monoclonais de *T. saginata* que apresentaram reatividade para a identificação de antígenos circulantes em amostras de soro de suínos e de humanos infectados com *T. solium*. Pela técnica de imunoblot o anticorpo monoclonal reconheceu no antígeno de excreção/secreção de *T. saginata* um peptídeo de 65kDa.

Pela técnica de dot-ELISA, DRAELANTS et al., 1995, empregando anticorpo monoclonal anti-*T. saginata*, analisaram 40 amostras de soro de gado infectado experimentalmente com diferentes doses de ovos de *T. saginata*. Os autores observaram reatividade com 8 amostras de soro de suíno infectados experimentalmente, sugerindo a utilização dos anticorpos monoclonais para pesquisa da cisticercose suína.

SCIUTTO et al., 1998, realizaram estudo comparativo para a detecção de anticorpos e antígenos na cisticercose suína. Para a pesquisa de antígenos foi empregado o anticorpo monoclonal anti-*T. saginata* (HP10), que reconhecia o peptídeo de 66kDa de antígeno de líquido vesicular e de excreção/secreção de *T. crassiceps*. Antígenos e anticorpos foram detectados após 29 dias da infecção experimental, sendo observados até 200 dias após a infecção nos animais com alta carga parasitária.

Para a pesquisa de antígenos circulantes em soro de gado infectado com cisticercose, foram comparados dois anticorpos monoclonais – IgM e IgG, para o antígeno de secreção/excreção de *T. saginata*. Os anticorpos apresentaram diferente sensibilidade, sendo maior para o IgG, que foi de 98,7% enquanto que para o monoclonal IgM foi de 93,4% (VAN KERCHOVEN et al., 1998).

O anticorpo monoclonal para antígenos de excreção/secreção de *T. solium* foi empregado em teste ELISA para a pesquisa de cisticercose suína e apresentou sensibilidade e especificidade de 92% e 100%, respectivamente (D'SOUZA & HAFEEZ, 1999).

A pesquisa de antígenos mostra-se uma ferramenta importante para o diagnóstico, acompanhamento e não somente para estudos epidemiológicos na NC, mas também para a triagem de pacientes e animais com suspeita de cisticercose e nos pacientes em tratamento. O emprego de anticorpos monoclonais produzidos para os antígenos de secreção/excreção demonstram a importância destes antígenos, devido a capacidade imunogênica e de sua utilização na produção de anticorpos para a pesquisa de antígenos (ESPÍNDOLA et al., 2002).

O emprego do antígeno heterólogo de secreção/excreção de *T. crassiceps* na obtenção de anticorpos policlonais (PARDINI et al., 2001) e monoclonais, surge como uma importante fonte alternativa para a produção de anticorpos e de sua aplicação em testes imunológicos para a detecção de antígenos em amostras de LCR de pacientes com NC.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica imunoenzimática ELISA para a detecção de antígenos em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose. O teste de imunoblot também foi empregado para a caracterização dos antígenos encontrados nas amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

1. OBTENÇÃO DE PARASITAS

1.1. Obtenção de cisticercos de *Taenia solium*

Os cisticercos de *T. solium* foram obtidos de carne de suínos naturalmente infectado, cedida pelo Prof. Dr. Paulo Sérgio de Arruda Pinto da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Os cisticercos foram retirados das fibras musculares com auxílio de bisturi, removendo-se cuidadosamente todo o tecido conectivo. Os parasitas foram exaustivamente lavados em água destilada e posteriormente com solução salina, e processados para a obtenção do extrato total de *T. solium*. Os cistos em degeneração foram desprezados.

1.2. 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 Larralde do Instituto de Investigaciones Biomédicas da Universidad Nacional Autonoma de México. Desde 1990, a cepa vem sendo mantida por passagens intraperitoneais, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade.

Os parasitas foram mantidos por inoculação intraperitoneal de 5 a 10 vesículas pequenas (sem brotamentos visíveis), em suspensão com volume mínimo (cerca de 200µL) de solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M pH 7,2 (PBS). A inoculação foi feita com o auxílio de agulha hipodérmica de calibre 25 x 7 mm.

Após noventa dias, os animais apresentando aumento de volume peritoneal foram sacrificados e retirados os cisticercos, que foram lavados exaustivamente com água destilada e após com solução salina, sendo desprezados aqueles em fase de degeneração ou calcificação.

2. EXTRATOS ANTIGÊNICOS

2.1. Total de cisticercos *Taenia solium* (T-Tso)

Os cisticercos íntegros de *T. solium*, após liofilização foram reconstituídos com solução salina (1mL/100 mg de pó) e homogeneizados em banho de gelo por 5 minutos e o sobrenadante foi tratado por ultra-som (Ultrasonic Power Unit /MSE, USA) em 4 ciclos de 30 segundos a 1mA e 20kHz, em banho de gelo. O extrato foi centrifugado duas vezes a 10.000 x g durante 30 minutos, obtendo-se o sobrenadante que constituiu o extrato antigênico T-Tso. Ao antígeno obtido foi adicionado inibidor de proteases fenil-metil-sulfonil-fluoreto pré-diluído em metanol (PMSF Sigma Chem. Co., USA), na concentração 4×10^{-1} mM e, então dividido em alíquotas e conservado a -20°C. (VAZ et al., 1997)

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

Os cisticercos íntegros foram rompidos com auxílio de bastão de vidro e centrifugados a 15.000 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, na concentração final de 4×10^{-1} mM e, então, dividido em alíquotas e conservado a -20°C (VAZ et al., 1997).

2.3. Peptídeos <30kDa DE LV-Tcra (Tcra <30kDa)

Em análise anterior por densitometria, foi observado que os peptídeos <30kDa constituem cerca de 50% do conteúdo protéico no antígeno LV-Tcra (BUENO, 1999). A partir deste resultado, o antígeno Tcra <30kDa foi

preparado em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) gel gradiente de 7-15%, a partir do antígeno LV-Tcra que foi aplicado na concentração de 4µg/mm do pente. Foi cortado do gel apenas a faixa de peso molecular inferior a 30kDa, emulsificado com solução fisiológica 0,85% e adjuvante completo de Freund.

2.4. Antígeno de Secreção e Excreção de *Taenia crassiceps* (ES-Tcra) *in vitro*

O antígeno ES-Tcra foi preparado conforme descrito por ESPÍNDOLA et al., 2002.

Aproximadamente 40 larvas pequenas (sem brotamentos visíveis) de *T. crassiceps* foram cultivadas em garrafas de plástico estéreis contendo 10mL de PFHM-protein-free hybridoma medium (Gibco, Grand Island, NY), suplementado com os antibióticos penicilina e estreptomicina na concentração de 50µg/mL e fungizone a 2,5µg/mL (Gibco). As garrafas foram mantidas à temperatura ambiente e as trocas do meio foram efetuadas nas 48 e 72 horas.

O meio de cultura nas duas trocas deram origem a “pool” de aproximadamente 200mL cada (ES48 e ES72). Como controle foi utilizado líquido vesicular (C-LV), obtido por ruptura dos cistos na mesma proporção parasita/meio, e como controle negativo foi utilizado uma alíquota do meio. Os “pool” ES e controles foram concentrados aproximadamente 36x usando membrana YM-1 (Amicon, Beverl, MA) e estocados a -20°C.

3. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS

3.1. Dosagem Protéica e Rendimento

As proteínas dos antígenos T-Tso e LV-Tcra foram dosadas pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando albumina bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) como padrão.

3.2. SDS-PAGE

Os extratos antigênicos T-Tso e LV-Tcra foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato duodecil de sódio (SDS-PAGE), 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 minigel 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 T-Tso e LV-Tcra foram aplicados na concentração de 5µg/mm e 7µg/mm do pente. Os antígenos foram tratados em tampão de amostra 5 vezes concentrado aquecidos durante 5 minutos em Banho-maria. Foi utilizado padrão de peso molecular de 14,4 a 94kDa, 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 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, até a chegada do marcador azul de bromofenol no final do gel.

3.2.1. Padrão Total de Peptídeos por SDS-PAGE

A coloração do gel foi realizada pela fixação do mesmo durante 30 minutos em solução fixadora à temperatura ambiente, e em solução corante (Comassie Blue) durante 3 a 5 minutos a 56°C. Após, o gel foi descorado em solução descorante 3 x 10 minutos, e colocado em água destilada.

Para a caracterização do antígeno ES-Tcra, o gel foi corado pela prata (Bio-Rad, Inc., Califórnia, EUA). Os géis foram corados ou transferido para realização do imunoblot.

Os cálculos de mobilidade relativa (*relative front*, *RF*) e peso molecular (PM) foram calculados segundo LAMBIN et al., 1976.

4. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- CISTICERCOS (SOROS IMUNES)

4.1. Imunização dos Animais

Um grupo de seis coelhos albinos de procedência da Nova Zelândia foram imunizados com os antígenos T-Tso, LV-Tcra e Tcra<30kDa, dois animais para cada antígeno.

Os coelhos foram imunizados conforme protocolo: antes da imunização foram colhidos 20mL de sangue total de cada coelho e depois da coagulação, o sangue foi centrifugado e foi feita a separação dos soros. Cada antígeno foi aplicado em dois animais, na concentração de 100µg de proteína do antígeno para cada animal, em quatro pontos, região dorsal (costas), em adjuvante completo de Freund (ACF) (Sigma Chem. Co) em volume final de 1mL (aplicando-se cerca de 250µL em cada ponto). Após 15 dias, foi aplicada uma nova dose em adjuvante incompleto de Freund (AIF) (Sigma). Foi realizada coleta de sangue no 30º dia e 45º dia. Após a realização do teste ELISA com os soros coletados nos diferentes dias para foi determinada a sangria total dos animais. Devido a menor resposta imune apresentada pelos coelhos imunizados com o antígeno Tcra<30kDa foram realizadas mais duas inoculações quinzenais em AIF.

Todas as sangrias foram feitas pela via EV (veia auricular), exceto a sangria total, que foi realizada via punção cardíaca.

4.2. Fracionamento dos Soros Imunes – Obtenção da Fração IgG Imune

Após sangria, os soros imunes foram fracionados para a obtenção da fração IgG, segundo metodologia descrita por McKINNEY & PARKINSON, 1987.

O soro de coelho foi diluído 5 vezes (1:4) em tampão acetato de sódio

60mM pH 4,0 e o pH da solução foi acertado para 4,5 com ácido acético. A seguir, foi adicionado ácido caprílico, volume de 25 μ l/para cada mL de soro, gota a gota e agitado 30 minutos à temperatura ambiente. O soro foi então centrifugado a 10.000g durante 30 minutos, duas vezes. Ao sobrenadante foi adicionado PBS 10x concentrado (10 partes do sobrenadante para 1ml de PBS 10x concentrado) e o pH foi acertado para 7,4 com solução de NaOH 5N. O sobrenadante foi resfriado a 4°C em banho de gelo e adicionou-se sulfato de amônio na concentração de 0,277g/mL e agitado durante 30 minutos à temperatura ambiente. Foi realizada nova centrifugação a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi reservado e o “pellet” foi resuspenso em PBS, na concentração de 1/10 do volume original. Após, realizou-se aquecimento a 50°C durante 20 minutos. O soro foi centrifugado a 10.000 g durante 20 minutos. O soro foi então dividido em alíquotas e armazenado a – 20°C.

4.3. Caracterização da Fração IgG Imune

4.3.1. Dosagem Protéica

A dosagem protéica das frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa foi realizada diluindo-se a amostra 1:10 em tampão PBS pH 7,2. Foi efetuada leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 280nm. A densidade óptica foi multiplicada pelo fator 0,74 e também pela diluição efetuada, obtendo-se a concentração final em mg/mL.

4.3.2. Eletroforese

Afim de se verificar a eficiência do processo de fracionamento, foi realizada a eletroforese segundo metodologia descrita por MOURA et al., 1982.

4.3.3. Caracterização da Especificidade dos Anticorpos - Reatividade Homóloga e Heteróloga das Frações IgG

As frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa foram ensaiados por ELISA com os antígenos T-Tso e LV-Tcra utilizados na concentração de proteína de 1µg. Os soros controle e as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa, foram utilizados em diferentes diluições. As placas foram bloqueadas durante 1 hora em solução bloqueadora. Como conjugado foi utilizada imunoglobulina de carneiro anti-IgG de coelho marcada com peroxidase (Sigma Chem Co.), diluída a 1:20.000. A reação enzimática foi revelada com adição de solução substrato-cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) (BioRad Laboratories Inc., USA), incubado durante 20 minutos ao abrigo da luz. A reação enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N. A intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas (Diagnostics Pasteur, Strasbourg-Schiltigheim, França) em comprimento de onda 450nm.

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

Em cada teste foi realizado um controle-branco que constituiu-se do teste sem amostra para se verificar a reatividade de fundo (*back-ground*) da reação. Esta leitura não poderia exceder 0,100 de absorbância.

4.3.3.1. Titulação em bloco por ELISA das Frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG-Tcra<30kDa frente aos antígenos T-Tso e LV-Tcra

Após a verificação da reatividade específica e reatividade cruzada das frações IgG foi realizada uma segunda titulação também por ELISA em que, os extratos antigênicos T-Tso e LV-Tcra foram utilizados em diferentes concentrações protéicas variando de 1µg/100µL a 0,5ng/100µL. As frações IgG também foram utilizados em diferentes diluições.

Os ensaios foram realizados como descrito no **item 4.3.3.**

4.3.3.2. Imunoblot

As frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa foram ensaiados por imunoblot, frente aos antígenos T-Tso e LV-Tcra, para verificação da reatividade homóloga e heteróloga de cada fração.

Os extratos antigênicos T-Tso e LV-Tcra foram separados em SDS-PAGE segundo **item 3.2**.

Na transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose de 0,2 μ (Milipore, USA), utilizou-se papel-filtro nº3 e nº1(Whatman, England), em que foi feito um sanduíche com 3 papel-filtro nº3 filtro nº1, a membrana de nitrocelulose, o gel e a mesma sequência de papéis, todos previamente embebidos em tampão de transferência. 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.

Após a transferência dos extratos antigênicos T-Tso e LV-Tcra separados 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 o soro controle (antes da imunização) e as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa foram diluídos a 1:50 e 1:500 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 de coelho marcada com peroxidase diluída a 1:2.000 em solução diluente e incubada durante 2 horas. A reação foi revelada com solução substrato-cromógeno 4-cloro-naftol sob agitação constante até o aparecimento das bandas reativas e, então, bloqueada com água destilada.

5. OBTENÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ES-Tcra (monoclonal anti-ES-Tcra)

O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi obtido segundo ESPÍNDOLA et al., 2002.

Um grupo de 4 camundongos BALB/c foram imunizados pela via subplantar com 10µg de antígeno ES-Tcra em 15µL de salina e emulsificado na mesma proporção em ACF. Após 19 dias os animais receberam uma dose reforço. Os camundongos foram sangrados pelo plexo oftálmico. A cinética da produção dos anticorpos foram verificadas por ELISA para reatividade específica com antígeno LV-Tcra e cruzada com T-Tso. Os anticorpos também foram ensaiados por imunoblot. Cerca de 10 dias da aplicação da dose de reforço, foi possível proceder a retirada dos linfonodos dos animais imunizados.

Os hibridomas foram obtidos com o preparo das células de mieloma SP2-O. A fusão celular foi realizada de acordo com KÖHLER & MILSTEIN, 1975, com algumas modificações.

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

O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi específico para os epítomos presentes nos peptídeos de 30, 18 e 14kDa.

5.1. Utilização do Anticorpo Monoclonal anti-ES-Tcra

5.1.1. Cromatografia de Afinidade para Purificação de antígeno LV-Tcra com Anticorpo Monoclonal anti-ES-Tcra

O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi acoplado à Sepharose ativada e utilizado para preparar coluna de afinidade e purificar o antígeno LV-Tcra. Na purificação, foi utilizado um volume de 10mL de LV-Tcra a 1,4mg/mL.

Para o acoplamento anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra à resina, aproximadamente 1 grama de resina Sepharose 4B (Pharmacia) foi suspensa em 10mL de HCl a 1 mM. O gel inchado foi imediatamente lavado em 200mL desse ácido e com 50mL tampão de acoplamento (NaHCO_3 a 1,M e NaCl a 0,5M, pH 8,3) em um funil de porcelana adaptado a uma placa porosa. Após esse procedimento, foram misturados o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, previamente dialisado contra o tampão de acoplamento, e a resina, na proporção de 3mg de anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra para cada mL de resina. A mistura foi mantida sobre agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Uma amostra do sobrenadante foi retirada para calcular a porcentagem de conjugação do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra à resina. Os grupos ativados da resina que não se ligaram ao anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foram bloqueados por 2 horas sob agitação, com glicina na concentração final de 3,5% (P/V). A resina foi então mantida em repouso por 16 horas a 4°C. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens com tampão glicina/HCl, alternando com o tampão borato/salina para retirar os anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra que não se ligaram a Sepharose 4B. Em seguida, a coluna foi montada e utilizada para fracionamento do antígeno LV-Tcra (ESPÍNDOLA, 2004).

Inicialmente, o antígeno foi previamente dialisado contra o tampão borato-salina e aplicado à coluna, e seguiu-se lavagem com o mesmo tampão até a saída total do primeiro pico das amostras. Para eluição das proteínas ligadas, foi utilizado o tampão glicina/HCl a 0,2M, pH 2,8. Após a coleta das amostras do segundo pico, a coluna foi novamente equilibrada com o tampão borato-salina. As amostras coletadas foram neutralizadas com Tris a 1M. Os eluatos do antígeno coletado no segundo pico foram concentrados em membrana YM-1, e dialisados contra o tampão borato-salina. As amostras foram estocadas a -20°C (ESPÍNDOLA, 2004).

5.1.2. Titulação do Anticorpo Monoclonal anti-ES-Tcra não marcado por ELISA frente aos antígenos T-Tso e LV-Tcra

O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi ensaiado por ELISA com os antígenos T-Tso e LV-Tcra utilizados nas concentrações de proteína em $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ 1 e 0,1 μg , e em $\text{ng}/100\mu\text{L}$ 50, 20, 10, 5 e 1. O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi empregado na diluição de 1:10 para o antígeno T-Tso e 1:200 para o antígeno LV-Tcra. As placas foram bloqueadas durante 1 hora em solução bloqueadora. Como conjugado foi utilizada imunoglobulina de carneiro anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase (Sigma Chem Co.), diluída a 1:500.

Os ensaios foram realizados como descrito no **item 4.3.3**.

5.1.3. Titulação do Anticorpo Monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado por ELISA frente aos antígenos LV-Tcra e ES-Tcra

O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado foi ensaiado por ELISA com os antígenos LV-Tcra e ES-Tcra utilizados nas concentrações de proteína em ng 100, 50, 20, 10, 5 e 1. O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado foi empregado na diluição de 1:1.000. As placas foram bloqueadas durante 1 hora em solução bloqueadora. Como conjugado foi utilizada avidina-peroxidase (Sigma), diluída a 1:10.000.

Os ensaios foram realizados como descrito no **item 4.3.3**.

5.1.4. Blot com antígeno LV-Tcra purificado com Anticorpo Monoclonal anti-ES-Tcra

O extrato antigênico LV-Tcra purificado com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi separado em SDS-PAGE segundo **item 3.2**, e aplicado nas concentrações de 100, 50, 20, 10, 5 e 1 ng . A transferência eletroforética foi realizada conforme descrito no **item 4.3.3.2**.

Após a transferência do extrato antigênico LV-Tcra purificado com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra separado por SDS-PAGE, as membranas de PVDF foram 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 detecção de antígenos nas diferentes concentrações foi empregado o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra na diluição de 1:50 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 de camundongo marcada com fosfatase alcalina diluída a 1:2.000 em solução diluente e incubada durante 2 horas. A reação foi revelada com solução substrato-cromógeno NBT-BCIP sob agitação constante até o aparecimento das bandas reativas e, então, bloqueada com água destilada.

Também foi empregado como conjugado o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinalado/avidina-peroxidase diluídos respectivamente, a 1:300 e 1:750 em PBS-T. A reação foi revelada com solução por quimioluminescência (ECL plus Western Blotting Detection System) (Pharmacia). A membrana foi incubada com o substrato luminescente (oxidação da diacilidrazida – luminol e acridina) durante 7 min sob agitação e após a retirada do excesso foi exposto ao filme (Hyperfilm, ECL – High Performance Chemiluminescence Film) (Pharmacia) durante 1 min, e então revelado (Revelador e Reforçador Dental Readymatic, Kodak Brasileira e Ind. Ltda., São José dos Campos, Brasil) e fixado (Fixador e Reforçador Dental Readymatic, Kodak Brasileira e Ind. Ltda., São José dos Campos, Brasil), e depois colocado em água destilada e seca à temperatura ambiente.

6. AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO

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

Este estudo foi realizado de acordo com as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, vigentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), após parecer favorável da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do mesmo HCFMUSP, obedecendo protocolo de pesquisa nº072/97, de acordo com a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre o assunto (BRASIL, 1996).

O trabalho também foi submetido as normas éticas para pesquisa de acordo com a Comissão Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

6.1. Grupo Neurocisticercose (Grupo NC)

Foram analisadas 125 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de NC, sendo 62 amostras provenientes do laboratório de Líquor do HCFMUSP (**ANEXOS I e II**). É importante lembrar que as amostras foram ensaiadas em diferentes épocas.

Neste estudo também foram utilizadas 40 amostras de LCR de pacientes classificadas de acordo com exame de imagem e aspectos morfológicos de acordo com MACHADO et al., 1990, sendo 11 (27,5%) pertenciam ao tipo III (quando são visualizados cistos associados a processo inflamatório e/ou degeneração); 13 (32,5%) pertenciam ao tipo IV (quando há apenas calcificações nodulares) e 15 (40%) pertenciam a formas mistas (nas formas mistas há dois ou mais tipos de imagens) (**ANEXO III**).

Outras 21 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico de fase ativa da doença também foram utilizadas neste estudo (**ANEXO IV**).

6.2. Grupo “Suspeito” Neurocisticercose (Grupo S-NC)

Foram ensaiadas 68 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de “suspeita” para NC, provenientes do Laboratório de Líquor do HCFMUSP. As amostras foram divididas em positivas (50 amostras) ou inconclusivas (18 amostras) para NC pelo kit comercial BioELISA Neurocisti para pesquisa de anticorpos anti-*T. solium* com antígeno de *T. solium* (Biolab Diagnóstica SA, Jacarepaguá, RJ, Brasil) (ANEXO V).

6.3. Grupo Controle (Grupo C)

Foram analisadas 92 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial negativo para NC, provenientes do laboratório de Líquor da HCFMUSP (ANEXOS VI, VII e VIII).

6.4. Grupo de Outras Patologias (Grupo OP)

Foram analisadas 17 amostras de LCR de pacientes com diversas doenças neurológicas (outras patologias) – meningite viral (8), neoplasia pulmão (2), neoplasia mama (1), meningoencefalite (1), neurosífilis (3), HTLV-1 (1) e criptococose (1) (ANEXO IX).

7. PESQUISA DE ANTÍGENOS EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO

7.1. Testes Imunológicos

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

7.2. ELISA utilizando as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa

Inicialmente as placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 50µl de amostra (LCR) + 50µl de tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 durante 18h em câmara úmida a 4°C. O bloqueio foi feito por 2 horas com leite desnatado a 5% em PBS-T.

O controle do soro foi diluído a 1:100 e a fração IgG anti-Tcra<30kDa a 1:50, e as frações IgG anti-Tso a 1:100 e 1:500 e IgG anti-Tcra a 1:500, conforme lote utilizado no teste.

Como conjugado foi utilizada imunoglobulina de carneiro anti-IgG de coelho marcada com peroxidase (Sigma Chem Co.), diluída a 1:20.000. A reação enzimática foi revelada com adição de solução substrato-cromógeno TMB, incubado durante 20 minutos ao abrigo da luz. A reação enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N. A intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas em comprimento de onda 450 nm.

Foram realizadas lavagens das placas entre as etapas de bloqueio, incubação de amostra e incubação do conjugado, com solução salina contendo 0,05% de Tween 20.

Em cada teste foi realizado um controle-branco que constituiu-se do teste sem amostra para se verificar a reatividade de fundo (*back-ground*) da reação. Esta leitura não poderia exceder 0,100 de absorbância.

7.3. ELISA utilizando anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra

Inicialmente as placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 50µl de amostra (LCR) + 50µl de tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 durante 18h em câmara úmida a 4°C. O bloqueio foi feito por 2 horas com leite desnatado a 5% em PBS-T.

O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi diluído a 1:200. O conjugado utilizado foi imunoglobulina de cabra anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase diluído a 1:2.000. A solução substrato-cromogênica foi

adicionada em seguida, e a reação enzimática foi bloqueada após 10 minutos com ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas em comprimento de onda 450 nm.

Foram realizadas lavagens das placas entre as etapas de bloqueio, incubação do anticorpo monoclonal e incubação do conjugado, com solução salina contendo 0,05% de Tween 20.

7.4. ELISA Competição

7.4.1. Com anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra

Inicialmente as placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com antígeno LV-Tcra na concentração de 0,1µg/100µl em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 durante 18h em câmara úmida a 4°C. Após bloqueio de duas horas à 37°C com leite desnatado a 5% em PBS-T, o antígeno LV-Tcra foi diluído em diferentes concentrações (µg) – 1,0; 0,1; 0,5; 0,01; 0,005; 0,001 e misturado ao anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra diluído a 1:1.000, 1:2.000 e 1:5.000. Como conjugado foi utilizada imunoglobulina de cabra anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase diluída a 1:4.000. A solução substrato-cromogênica foi adicionada em seguida, e a reação enzimática foi bloqueada após 5 minutos com ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas em comprimento de onda 450 nm.

Foram realizadas lavagens das placas entre as etapas de bloqueio, incubação do anticorpo monoclonal e incubação do conjugado, com solução salina contendo 0,05% de Tween 20.

7.4.2. Com fração IgG anti-Tcra

O teste foi realizado como descrito no **item 7.4.1**. A fração IgG anti-Tcra foi diluída a 1:500 e 1:1.000. Como conjugado foi utilizada imunoglobulina de cabra anti-IgG de coelho marcada com peroxidase, diluída a 1:20.000. A solução substrato-cromogênica foi adicionada em

seguida, e a reação enzimática foi bloqueada após 5 minutos com ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas em comprimento de onda 450 nm.

Foram realizadas lavagens das placas entre as etapas de bloqueio, incubação da fração IgG anti-Tcra e incubação do conjugado, com solução salina contendo 0,05% de Tween 20.

7.4.3. Com anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com NC

Inicialmente as placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com antígeno ES-Tcra na concentração de 50ng/100µl em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 durante 18h em câmara úmida a 4°C. Após bloqueio de duas horas à 37°C com leite desnatado a 5% em PBS-T, para a competição foi adicionado 50µL de LCR misturado a 50µL do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinalado diluído a 1:1.000 e incubados durante 30min à temperatura ambiente e após então foram adicionados 100µL à placa previamente sensibilizada. Como conjugado foi utilizada avidina/peroxidase diluída a 1:1.000 e incubada durante uma hora a 37°C e a revelação foi feita com solução substrato-cromogênica TMB durante 15 minutos a 37°C. Em seguida, e a reação enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas em comprimento de onda 450 nm. Foram realizadas lavagens das placas entre as etapas de bloqueio, incubação da amostra e do anticorpo monoclonal e incubação do conjugado, com solução salina contendo 0,05% de Tween 20.

7.5. ELISA Sanduíche utilizando fração IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra

Inicialmente as placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com a fração IgG anti-Tcra diluída a 1:500 em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 durante 18h em câmara úmida a 4°C. Após bloqueio de duas horas à 37°C com leite desnatado a 5% em PBS-T, o antígeno LV-Tcra foi diluído em diferentes concentrações ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) – 1,0; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra diluído a 1:200, incubados 12h em câmara úmida a 4°C. A seguir da lavagem, foi adicionado o conjugado a imunoglobulina de cabra anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase. O conjugado foi absorvido com células sensibilizadas com IgG anti-Tcra de coelho. A solução substrato-cromogênica foi adicionada em seguida, e a reação enzimática foi bloqueada após 5 minutos com ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração foi quantificada em leitor de placas em comprimento de onda 450 nm.

Foram realizadas lavagens das placas entre as etapas de bloqueio, incubação da fração IgG anti-Tcra e incubação do conjugado, com solução salina contendo 0,05% de Tween 20.

7.6. Cálculo do Limiar de Reatividade (*cut-off*) e Índice de Reatividade (IR)

Devido as amostras de LCR de pacientes com NC, de pacientes do grupo controle e de pacientes do GOP terem sido ensaiadas em diferentes momentos, também foram determinados diferentes *cut-off*.

Para a pesquisa de antígenos com as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, os *cut-off* foram determinados a partir da análise do Grupo Controle, pela média de D.O. acrescido de dois desvios-padrão. Para a fração IgG anti-Tcra<30kDa o *cut-off* foi pré-estabelecido em 0,81. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram D.O. igual ou superior ao valor do *cut-off*.

Para facilitar a análise comparativa dos resultados obtidos também foi calculado o índice de reatividade (IR), sendo este determinado para as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, o IR foi obtido a partir da divisão da D.O. das amostras pelo *cut-off*. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram IR igual ou superior a 1,0.

8. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DETECTADOS NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO POR IMUNOBLOT

Para inicial caracterização dos peptídeos identificados nas amostras de LCR de pacientes com NC e das amostras de LCR do Grupo OP foi realizado SDS-PAGE mini-gel a 15%. As amostras foram tratadas com tampão de amostra 5% concentrado com ditioneitol (DTT) (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA) a 15mM na proporção de 80µL de amostra (LCR) + 20µL de tampão de amostra (as amostras foram selecionadas de acordo com o volume). A corrida eletroforética foi realizada segundo **item 3.2.**

O ensaio de imunoblot foi realizado de acordo com a descrição do **item 4.3.3.2.** As frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foram diluídas a 1:50. Como conjugado foi utilizado anti-IgG de coelho ou de camundongo marcado com fosfatase alcalina, diluída a 1:1.500 e 1:2.000, respectivamente (Bio-rad). Como revelador foi utilizado 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato nitro-blue tetrazolium (NBT/BCIP) (Sigma).

Na reação foi utilizada como controle tiras de antígenos T-Tso e LV-Tcra incubadas com as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra.

Para o controle dos conjugados – anti-IgG humana marcada com avidina-biotina e anti-IgG de camundongo marcada com fosfatase alcalina, também foram ensaiadas, por imunoblot, três “pool” de LCR de pacientes em fase ativa da doença para verificação da reatividade inespecífica com as

imunoglobulinas encontradas nas amostras de LCR.

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS

1.1. Dosagem Protéica e Rendimento

Na **tabela 1** estão representados as quantidades de antígeno obtidas, a concentração e o total de proteínas, bem como o rendimento de antígenos obtidos T-Tso e LV-Tcra.

Tabela 1: Volume, concentração ([]) protéica, quantidade total de proteína obtida de cada antígeno - LV-Tcra e T-Tso.

Antígeno	Volume (mL)	[] (mg/mL)	Total de proteína (mg)
T-Tso	27,0	6,7	180,9
LV-Tcra	220,0	1,4	308,0

A concentração de proteínas em mg/mL excretadas/secretadas pelas larvas viáveis de *T. crassiceps* (mg/mL) durante o cultivo das vesículas em meio de cultura foram para ES24, ES48, ES72 e ES144 respectivamente, 1,1; 4,5; 0,002 e 0,004.

1.2. SDS-PAGE

1.2.1. Padrão Total de Peptídeos por SDS-PAGE

O padrão de peptídeos dos extratos antigênicos T-Tso, LV-Tcra e ES-Tcra, contendo 5µg/mm, separados por SDS-PAGE em condições redutoras e corados pelo Coomassie Blue, encontram-se na **figura 1**. O padrão de peso das frações de cada extrato antigênico foi calculado em relação aos padrões utilizados e ao Rf.

Figura 1: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% e coloração pelo Coomassie Blue, dos extratos antigênicos total de *Taenia solium* (A), líquido vesicular de *Taenia crassiceps* (B) e ES-Tcra (C) corado pelo nitrato de prata. À esquerda padrão de peso molecular em kDa (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4).

2. SOROS IMUNES

2.1. Imunização dos Animais

As **figuras 2 e 3** mostram os resultados dos testes ELISA com os soros controle, anti-Tso e anti-Tcra (30ºdia e 45ºdia) e anti-Tcra<30kDa (45ºdia e 60ºdia) com os extratos antigênicos T-Tso e LV-Tcra.

Figura 2: Resultados de ELISA (absorbância) de soro controle, anti-Tso, anti-Tcra e anti-Tcra<30kDa com o extrato antigênico total de *T. solium*.

Figura 3: Resultados de ELISA (absorbância) de soro controle, anti-Tso, anti-Tcra e anti-Tcra<30kDa com o extrato antigênico líquido vesicular de *T. crassiceps*.

2.2. Fracionamento dos Soros Imunes – Obtenção da Fração IgG Imune

Após o fracionamento dos soros imunes anti-Tso, anti-Tcra e anti-Tcra <30kDa, foram obtidas respectivamente, as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra-<30kDa.

2.3. Caracterização da Fração IgG Imune

2.3.1. Dosagem Protéica

A concentração protéica da fração IgG anti-Tso foi de 6,6mg/mL, da fração IgG anti-Tcra foi de 18,8mg/mL e da fração IgG anti-Tcra<30kDa foi de 20,0mg/mL.

2.3.2. Eletroforese

Os três soros imunes foram processados por eletroforese. Após a purificação, a identificação da fração IgG foi cerca de 95%. Com isso, a correção da concentração de IgG em cada soro foi de 6,3mg/mL para a fração IgG anti-Tso, 17,9mg/mL para a fração IgG anti-Tcra e 19,0mg/mL para a fração IgG anti-Tcra<30kDa.

2.3.3. Reatividade dos Anticorpos Policlonais - Reatividade Homóloga e Heteróloga das Frações IgG por ELISA

As **figuras 4A e 4B** mostram os resultados da titulação da fração IgG anti-Tso pelo teste ELISA – reatividade homóloga (**4A**) com antígeno T-Tso e heteróloga (**4B**) com antígeno LV-Tcra e soro controle diluídos a 1:100, 1:500, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000.

As **figuras 5A e 5B** mostram os resultados da titulação da fração IgG anti-Tcra pelo teste ELISA – reatividade homóloga (**5B**) com antígeno LV-Tcra e heteróloga (**5A**) com antígeno T-Tso e soro controle diluídos a 1:100, 1:500, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000.

As **figuras 6A e 6B** mostram os resultados da titulação da fração IgG anti-Tcra<30kDa pelo teste ELISA – reatividade homóloga (**6B**) com antígeno LV-Tcra e heteróloga (**6A**) com antígeno T-Tso e soro controle diluídos a 1:100, 1:500, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000.

Os extratos antigênicos T-Tso e LV-Tcra no teste ELISA foram utilizados na concentração protéica de 1µg/100µL.

(4A) **(4B)**

Figuras 4A e 4B: Resultados de ELISA – reatividade homóloga **(4A)** com antígeno total de *T. solium* e heteróloga **(4B)** com antígeno líquido vesicular de *T. crassiceps* e soro controle e fração IgG anti-Tso diluída a 1:100, 1:500, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000. Os antígenos foram utilizados na concentração protéica de 1µg/100µL.

De acordo com os resultados apresentados nas **figuras 4A e 4B** a fração IgG anti-Tso apresentou título de 1:500, quando ensaiada com os antígenos T-Tso e LV-Tcra.

(5A) **(5B)**

Figuras 5A e 5B: Resultados de ELISA – reatividade homóloga **(5B)** com antígeno líquido vesicular de *T. crassiceps* e heteróloga **(5A)** com antígeno total de *T. solium* e soro controle e fração IgG anti-Tcra diluída a 1:100, 1:500, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000. Os antígenos foram utilizados na concentração protéica de 1µg/100µL.

De acordo com os resultados apresentados nas **figuras 5A e 5B** a fração IgG anti-Tcra apresentou título de 1:5.000, com ambos os antígenos T-Tso **(5A)** e LV-Tcra **(5B)**.

(6A) **(6B)**

Figuras 6A e 6B: Resultados de ELISA – reatividade homóloga (6B) e heteróloga (6A) de soro controle e fração IgG anti-Tcra<30kDa diluída a 1:100, 1:500, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000 com extrato antigênico total de *T. solium* (6A) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (6B), ambos na concentração protéica de 1µg/100µL.

De acordo com os resultados apresentados nas **figuras 6A e 6B** a fração IgG anti-Tcra<30kDa apresentou título de 1:500, quando ensaiada com os antígenos T-Tso e LV-Tcra.

2.3.4. Titulação em Bloco das Frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa frente aos Antígenos T-Tso e LV-Tcra

As **figuras 7A** e **7B** mostram os resultados da titulação em bloco (teste ELISA) da fração IgG anti-Tso e do soro controle – reatividade homóloga (**7A**) com o antígeno T-Tso e heteróloga (**7B**) com o antígeno LV-Tcra diluídos a 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1.000. Os antígenos foram utilizados em diferente concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

As **figuras 8A** e **8B** mostram os resultados da titulação em bloco (teste ELISA) da fração IgG anti-Tcra e do soro controle – reatividade homóloga (**8B**) com o antígeno LV-Tcra e heteróloga (**8A**) com o antígeno T-Tso diluídos a 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1.000. Os antígenos foram utilizados em diferente concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

As **figuras 9A** e **9B** mostram os resultados da titulação em bloco (teste ELISA) da fração IgG anti-Tcra<30kDa e do soro controle – reatividade homóloga (**9B**) com o antígeno LV-Tcra e heteróloga (**9A**) com o antígeno T-Tso diluídos a 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1.000. Os antígenos foram utilizados em diferente concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

(7A)

(7B)

Figuras 7A e 7B: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade homóloga (7A) e heteróloga (7B) do soro controle e da fração IgG anti-Tso diluídos a 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1.000 ensaiados com extrato antigênico total de *T. solium* (7A) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (7B) em concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

(8A)

(8B)

Figuras 8A e 8B: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade heteróloga (8A) e homóloga (8B) do soro controle e da fração IgG anti-Tcra diluídos a 1:100, 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 ensaiados com extrato antigênico total de *T. solium* (8A) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (8B) em concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

(9A)

(9B)

Figuras 9A e 9B: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade heteróloga (9A) e homóloga (9B) do soro controle e da fração IgG anti-Tcra<30kDa diluídos a 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1.000 ensaiados com extrato antigênico total de *T. solium* (9A) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (9B) em concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

Na diluição 1:100, a fração IgG anti-Tso detectou 0,05µg e 0,001, para os antígeno T-Tso e de LV-Tcra. Com a titulação da fração IgG anti-Tcra diluída a 1:500 a detecção de antígeno para o T-Tso foi de 0,05µg e na diluição de 1:1.000 detectou o antígeno LV-Tcra até 0,005µg. Para a fração IgG anti-Tcra<30kDa diluída a 1:100 os antígenos T-Tso e LV-Tcra foram detectados até a concentração de 0,05µg.

Os títulos escolhidos para o emprego das frações em teste ELISA com as amostras de LCR foram de 1:100 para as frações IgG anti-Tso, 1:500 para a fração IgG anti-Tcra e 1:50 para a fração IgG anti-Tcra<30kDa.

2.3.5. Titulação em Bloco dos Anticorpos Monoclonal anti-ES-Tcra e anti-ES-Tcra biotinilado frente aos antígenos T-Tso, LV-Tcra e ES-Tcra

As **figuras 10A** e **10B** mostram os resultados da titulação em bloco (teste ELISA) do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra – reatividade heteróloga (**10A**) com o antígeno T-Tso e homóloga (**10B**) com o antígeno LV-Tcra. O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra diluído a 1:10 e 1:50 para o ensaio com o antígeno T-Tso e 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 para o antígeno LV-Tcra. Os antígenos foram utilizados em diferente concentração protéica variando de 1µg – 0,1ng/100µL.

A **figura 11** mostra os resultados da titulação em bloco (teste ELISA) do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado – reatividade homóloga com o antígeno LV-Tcra e ES-Tcra nas concentrações em ng/100uL de 50, 10 e 5.

(10A)

(10B)

Figuras 10A e 10B: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade heteróloga (10A) e homóloga (10B) do soro controle e do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra diluídos a 1:50 e 1:100 ensaiado com extrato antigênico total de *T. solium* (10A) e diluído a 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 ensaiado com o extrato antigênico líquido vesicular de *T. crassiceps* (10B), ambos em concentração protéica variando de 1µg – 0,5ng/100µL.

Figura 11: Resultados da titulação em bloco (teste ELISA) – reatividade homóloga do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinalado diluído a 1:1.000 ensaiado com extrato antigênico total de líquido vesicular e de excreção/secreção de *T.* ambos em concentração protéica variando de 1µg – 1ng/100µL.

Na diluição 1:10, o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra detectou 1µg e na diluição de 1:200 detectou 0,05µg, para os antígeno T-Tso e de LV-Tcra. Já o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinalado na diluição de 1:1.000 detectou 5ng para o antígeno LV-Tcra e 10ng para o antígeno ES-Tcra.

Os títulos escolhidos para o emprego dos anticorpo em teste ELISA O do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra com as amostras de LCR foi de 1:200. Para o ensaio de competição com o antígeno ES-Tcra utilizado na concentração de 50ng e o anticorpo monoclonal biotinalado na diluição de 1:1.000 e as amostras de LCR de pacientes com NC.

A **figura 12** mostra o ensaio de imunoblot realizado para caracterizar especificidade das frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa com os extratos antigênicos T-Tso e LV-Tcra.

A **figura 13** mostra o ensaio de imunoblot realizado para caracterizar a reatividade do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra com os extratos antigênicos T-Tso e LV-Tcra.

Figura 12: Imunoblot de soros controle reação (soro antes da imunização) (**tiras CR**) e controle branco (**tiras CB**) e da fração IgG anti-Tso (**tira 1**), IgG anti-Tcra (**tira 2**) e IgG anti-Tcra<30kDa (**tira 3**) frente ao extrato antigênico total de *T. solium* (**A**) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (**B**). À esquerda e ao centro padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

Figura 13: Imunoblot do soro controle (**tiras 1**) e do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra (**tira 2**) frente ao extrato antigênico total de *T. solium* (**A**) e líquido vesicular de *T. crassiceps* (**B**). As setas indicam os peptídeos de 18 e 14kDa. À esquerda e ao centro padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20, 1 e 14,4kDa).

3. PESQUISA DE ANTÍGENOS EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO

3.1. Teste ELISA com anticorpos policlonais

Os resultados foram obtidos a partir da análise de 40 amostras de LCR do Grupo NC e em 50 amostras de LCR dos pacientes do Grupo C, indicados na **figura 14**. Doze amostras (30%) do Grupo NC não apresentaram reatividade com a fração IgG anti-Tso, e nove mostras (18%) das amostras do Grupo C apresentaram reatividade. Sete amostras (17,5%) do Grupo NC não apresentaram reatividade com a fração IgG anti-Tcra, enquanto que uma amostra do Grupo C apresentou reatividade. Com a fração IgG anti-Tcra<30kDa uma amostra do Grupo NC (4,2%) não apresentou reatividade, e nenhuma amostra do Grupo C apresentou reatividade (**ANEXOS I, II, VI, e VII**).

Com a fração IgG anti-Tcra<30kDa, 24 amostras de LCR de pacientes do Grupo NC e 20 amostras de LCR de pacientes do Grupo C foram ensaiadas. Nenhuma amostra do Grupo C (100%) apresentou reatividade enquanto que uma amostra (5,0%) do Grupo NC não apresentou reatividade (**ANEXO II e VII**).

Também foram ensaiadas para a pesquisa de antígenos com as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra 40 amostras de LCR de pacientes em diferentes fases evolutivas da doença classificadas de acordo com MACHADO et al., 1990. A reatividade das frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra para as amostras em diferentes fases evolutivas da doença -- tipo III, IV e misto foi semelhante. Antígenos foram detectados em 100% das amostras do tipo III e misto com as duas frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra. Nas amostras classificadas como do tipo IV antígenos foram detectados em 76,9% com a fração IgG anti-Tso e em 92,3% com a fração IgG anti-Tcra. Estes resultados são mostrados na **figura 15 (ANEXO III)**.

Figura 14: Valores de índice de reatividade de ELISA para a detecção de antígenos em 64 amostras de LCR de pacientes do Grupo Neurocisticercose e 50 amostras do Grupo Controle ensaiadas com as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa. O *cut-off* (-) da reação é indicado na figura.

Figura 15: Valores de índice de reatividade de ELISA para a detecção de antígenos em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose em diferentes fases evolutivas da doença – tipo III, IV e misto (segundo MACHADO et al., 1990) ensaiadas com as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra. O *cut-off* (-) da reação é indicado na figura.

Duas das amostras (amostras 4 e 5) do tipo III apresentaram alteração celular e aumento de proteínas. Para a pesquisa de antígenos empregando as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra houve detecção de antígenos mas com índices que não variaram comparando-se aos resultados obtidos nas outras amostras do grupo. Estas amostras também foram ensaiadas para a pesquisa de anticorpos com os antígenos T-Tso e LV-Tcra (BUENO, 1999) e nas amostras 4 e 5 também houve maior detecção de anticorpos com os dois antígenos.

Para as amostras do tipo IV, cinco amostras (amostras 17, 18, 22, 23 e 24) apresentaram maiores variações nos índices citoprotéicos. Para a pesquisa de antígenos pudemos observar também maior reatividade comparadas as outras amostras do grupo, o mesmo ocorrendo para a pesquisa de anticorpos, com maior reatividade para as amostras 17, 22 e 24 que também apresentaram maior reatividade para a pesquisa de antígenos, comparada a reatividade dos outros dois grupos com amostras do tipo III e misto. Neste grupo, três amostras (amostras 19, 20 e 21) não apresentaram reatividade para a pesquisa de antígenos com a fração IgG anti-Tso, e uma destas três amostras também foi negativa com a fração IgG anti-Tcra. Para duas das três amostras, não foi observada alterações dos índices citoprotéicos.

No grupo de amostras do tipo misto, cinco amostras (amostras 25, 29, 30, 34 e 39) apresentaram alterações citoprotéicas. Destas cinco amostras, duas (amostras 34 e 39) apresentaram maior reatividade para a pesquisa de antígenos, comparada ao restante do grupo. Uma outra amostra (amostra 26) apresentou grande alteração dos níveis protéicos no entanto, não foi observada interferência quando realizada a pesquisa de antígenos já que a detecção dos mesmos com ambos os anticorpos não apresentaram maior reatividade comparada as demais amostras do grupo. Para a pesquisa de anticopos, não foi observada maior variação dos resultados no grupo para as cinco que apresentaram alterações nos índices citoprotéicos.

3.2. Teste ELISA com anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra

Vinte e uma amostras de LCR de pacientes em fase ativa de NC foram ensaiadas por ELISA para pesquisa de antígenos com a fração IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. Treze amostras (61,9%) apresentaram reatividade com a fração IgG anti-Tcra, enquanto que 17 amostras (80,9%) apresentaram reatividade com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, com concordância de 71,4%. Esses resultados são apresentados na **figura 16** (**tabela 2** e **ANEXO IV**).

Dezesete amostras do grupo OP foram ensaiadas com a fração IgG anti-Tcra e com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. Uma amostra (6,25%) (neurossífilis) apresentou reatividade com a fração IgG anti-Tcra. Quatro amostras (25%) (meningoencefalite, neurossífilis, duas amostras positivas para meningite viral) apresentaram reatividade com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, sendo que uma amostra de meningite viral apresentou a mesma leitura que o *cut-off* (**figura 16** e **ANEXO IX**).

Vinte e duas amostras do grupo C foram ensaiadas com a fração IgG anti-Tcra e com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra para a pesquisa de antígenos e nenhuma amostra apresentou reatividade (**figura 16** e **ANEXO VIII**).

Sessenta e oito amostras do grupo “suspeito” NC foram ensaiadas para pesquisa de antígenos com a fração IgG anti-Tso e com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. Dessas 68 amostras, 44 amostras apresentaram alteração citoprotéica (alteração nos índices de células e/ou proteínas), das quais 33 amostras eram anticorpo positivo por ELISA com o antígeno de *T. solium* (Biolab Diagnóstica S.A.). Dessas 33 amostras alteradas e anticorpo positivo, 27 (82%) amostras foram positivas para a pesquisa de antígenos utilizando um ou outro anticorpo, e 12 com ambos os anticorpos. Ainda, dessas 33 amostras, 13 (39,4%) foram reagentes com a fração IgG anti-Tcra, e 26 (78,8%) foram positivas com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, com copositividade de 36,4% entre os testes.

Das 11 amostras alteradas e com anticorpo negativo ou inconclusivo, oito (72,7%) amostras foram positivas para a pesquisa de antígenos empregando um ou outro anticorpo. Com a fração IgG anti-Tcra três amostras (27,3%) foram positivas para a pesquisa de antígenos, enquanto que com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, oito amostras (72,7%) foram reagentes, e os testes apresentaram 27,3% de copositividade.

Das 68 amostras “suspeitas” NC, 24 apresentavam citoprotéico “normal”, sendo 17 (70,8%) positivas e sete (29,2%) negativas para a pesquisa de anticorpos. Das 17 amostras “normais” e anticorpo positivo, cinco (29,4%) dessas amostras foram positivas para a pesquisa de antígenos com um ou outro anticorpo, e 12 amostras não apresentaram reatividade. Três amostras (17,6%) das 17 foram reagentes com a fração IgG anti-Tcra e com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra.

As outras sete amostras ensaiadas do grupo de 68 “suspeito” consideradas LCR citoprotéico “normal” e anticorpo negativo ou inconclusivo, não foram reagentes para a pesquisa de antígenos com ambos os anticorpos.

Estes resultados são apresentados na **tabela 2, figura 16 e ANEXO V.**

Tabela 2: Resultados de teste ELISA em porcentagem (%) para pesquisa de antígenos de amostras de LCR de pacientes do grupo Neurocisticercose; para as 39 amostras de LCR de pacientes com resultados de imagem classificadas de acordo com Machado et., 1990, ensaiadas com a fração IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra; vinte e uma amostras de LCR de pacientes em fase ativa da doença e 68 amostras de LCR de pacientes do grupo “suspeito” Neurocisticercose ensaiadas com a fração IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra.

Grupo	Citopro- técnico	Ac	IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra	IgG anti-Tso ou IgG anti-Tcra	IgG anti-Tcra e anti-ES-Tcra	IgG anti-Tcra ou anti-ES-Tcra	Total
Tipo III	Alterado	Positivo	3 (27,7%)	0	...	...	3
	“Normal”	Positivo	8 (72,72%)	0	...	...	8
Misto	Alterado	Positivo	7 (43,7%)	0	...	...	7
	“Normal”	Positivo	9 (56,2%)	0	...	...	9
Fase Ativa	Alterado	Positivo	...	...	10 (66,6%)	15 (100%)	15
	“Normal”	Positivo	...	...	1 (25,0%)	2 (50,0%)	3
	Alterado	Positivo	...	...	0	0	1
	“Normal”	Positivo	...	...	0	0	1
Tipo IV	Alterado	Positivo	6 (50,0%)	0	...	...	6
	“Normal”	Positivo	5 (41,6%)	6 (50,0%)	...	...	6
“Suspeito” Neurocisti	Alterado	Positivo	...	...	12 (36,4%)	27 (82,0%)	33
	Alterado	Negativo	...	...	3 (27,3%)	8 (72,7%)	11
	“Normal”	Positivo	...	...	3 (27,3%)	5 (29,4%)	17
	“Normal”	Negativo	...	...	0	0	7

Legenda: ...: dados não obtidos

Figura 16: Valores de índice de reatividade de ELISA para a detecção de antígenos em 22 amostras de LCR de pacientes do Grupo Controle (**Grupo C**); em 21 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose em fase ativa da doença (**Fase Ativa**); em 68 amostras de LCR de pacientes do Grupo "Suspeito" Neurocisticercose (LCR citoprotéico "Normal" ou Alterado com pesquisa de anticorpo anti-*T. solium* com resultado negativo/inconclusivo ou positivo); e em 17 amostras de LCR de pacientes do Grupo Outras Patologias (**Grupo OP**) ensaiadas ensaiadas com a fração IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. O *cut-off* (-) da reação é indicado na figura.

3.3. ELISA Competição utilizando anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e amostras de LCR de pacientes com NC

Na **figura 17** são mostrados os resultados de ELISA competição com oito amostras de LCR de pacientes e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado/avidina-peroxidase diluído a 1:1.000. A placa de ELISA foi sensibilizada com o antígeno ES-Tcra, e ao adicionarmos as amostras de LCR previamente incubadas com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado, pode-se observar diferentes índices de competição de acordo com a amostra ensaiada.

Figura 17: Resultados de ELISA competição com oito amostras de LCR de pacientes com NC e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado/avidina-peroxidase. A placa de ELISA foi sensibilizada com o antígeno ES-Tcra na concentração de 50ng/100µL, e após incubação prévia foi adicionado 50µL de LCR e 50µL de anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra marcado diluído a 1:1.000.

3.4. ELISA Competição utilizando anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e fração IgG anti-Tcra

Na **figura 18** são mostrados os resultados de ELISA competição com a fração IgG anti-Tcra. Os resultados demonstraram que houve competição até a concentração de $0,01\mu\text{g}/100\mu\text{L}$. Nas menores concentrações de antígeno na solução – 0,005 e 0,001 a competição foi maior, pois a fração IgG anti-Tcra interage com o antígeno LV-Tcra sensibilizada na placa, aumentando a sensibilidade do teste.

Figura 18: Resultados de ELISA competição com a fração IgG anti-Tcra. O antígeno LV-Tcra foi utilizado na concentração de $0,1\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ e a competição foi realizada entre o antígeno LV-Tcra nas concentrações ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$) – 1,0; 0,1; 0,5; 0,01; 0,005; 0,001, juntamente com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra diluído a 1:1.000.

3.5. ELISA Sanduíche utilizando fração IgG anti-Tcra

Na **figura 19** são apresentados os resultados do ELISA sanduíche com a fração IgG anti-Tcra diluída a 1:500 adsorvida a placa e o antígeno LV-Tcra diluído em diferentes concentrações ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$) – 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra diluído a 1:200. Como conjugado foi utilizado anti-IgG de camundongo absorvido a 1:2 com IgG de coelho.

Figura 19: Resultados de ELISA sanduíche com a fração IgG anti-Tcra diluída a 1:500 adsorvida a placa e o antígeno LV-Tcra diluído em diferentes concentrações ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$) – 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001. Como conjugado foi utilizado anti-IgG de camundongo absorvido a 1:2 com IgG de coelho.

4. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DETECTADOS NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO POR IMUNOBLOT

Para caracterização inicial dos peptídeos detectados nas amostras de LCR de pacientes com NC por ELISA, duas amostras do Grupo NC e duas amostras do Grupo C foram ensaiadas por imunoblot. Os peptídeos de 14 e 18kDa foram identificados nas amostras do Grupo NC, enquanto que o peptídeo de 34kDa foi considerado não específico, pois também foi identificado nas amostras do grupo C (**figura 20**).

Vinte amostras de LCR de pacientes em fase ativa da doença foram ensaiadas com a fração IgG anti-Tcra e com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra (**figura 21, ANEXO IV**). Com a fração IgG anti-Tcra uma amostra (amostra 4) apresentou reatividade para o peptídeo de 14kDa e duas amostras (amostras 8 e 9) foram reagentes para o peptídeo de 18kDa. Já com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra sete amostras (amostras 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 17) apresentaram reatividade para o peptídeo de 14kDa.

As amostras de LCR de pacientes com NC foram tratadas com células de *Staphylococcus aureus*, cepa Cowan I. As amostras absorvidas foram ensaiadas por imunoblot com a fração IgG anti-Tcra e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e continuaram apresentando o mesmo padrão de reatividade para os peptídeos acima de 30kDa, mesmo após tratamento. Em sua superfície o *S. aureus* possui proteína A que apresenta peso molecular de 43kDa (KIKUCHI et al., 1999). Quando as amostras de LCR foram tratadas com as células, continuaram reagindo com os anticorpos, o mesmo acontecendo em nosso controle em que somente a célula foi aplicada ao gel e após transferência reagiu com a fração IgG anti-Tcra e com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra em 43kDa peso molecular da proteína A que apresenta afinidade para IgG. As amostras foram centrifugadas e aplicamos no gel o sobrenadante que mesmo assim, poderia ainda conter produtos da célula lisada que foram reconhecidos no imunoblot.

Das 68 amostras do grupo “suspeito” NC, nove amostras foram ensaiadas por imunoblot com a fração IgG anti-Tcra e anticorpo

monoclonal anti-ES-Tcra. As nove amostras apresentavam e/ou índice de células ou proteínas alteradas, e todas eram positivas para a pesquisa de anticorpos. Em três amostras os peptídeos de 14 e 18kDa foram identificados com os dois anticorpos, e em duas amostras o peptídeo de 18kDa foi caracterizado pela fração IgG anti-Tcra e pelo anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. Nas outras quatro amostras, houve reatividade somente com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra que caracterizou o peptídeo de 18kDa.

Também foram ensaiadas por imunoblot as amostras de LCR do Grupo OP que apresentaram reatividade no teste ELISA para a pesquisa de antígenos com a fração IgG anti-Tcra e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. As amostras não apresentaram reatividade com os peptídeos de baixo peso molecular de 14 e 18kDa, apresentando reatividade para os peptídeos acima de 30kDa.

Figura 20: Imunoblot dos antígenos T-Tso (A) e LV-Tcra (B) como controle negativo (tira 1), com a fração de IgG anti-Tso (tira 2) e fração IgG anti-Tcra (tira 3). Duas amostras do grupo Neurocisticercose (tiras 4 e 5) e duas amostras do grupo Controle (tiras 6 e 7) foram ensaiadas com a fração IgG anti-Tso (C) e fração IgG anti-Tcra (D). À esquerda e ao centro padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa). As setas indicam os peptídeos de 14 e 18kDa.

Figura 21: Imunoblot de vinte amostras de LCR de pacientes com NC em fase ativa da doença (C) utilizando a fração IgG anti-Tcra (I) e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra (II). Controles: antígenos T-Tso (A) e LV-Tcra (B), tira CB controle branco, tira C+ controle positivo, com a fração de IgG anti-Tcra (I) e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra (II). À esquerda e ao centro padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

Para verificação da reatividade inespecífica dos conjugados frente as imunoglobulinas das amostras de LCR, três “pool” (P1, P2, P3) de LCR de pacientes com NC em fase ativa foram ensaiados por imunoblot e foi utilizado como conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina e anti-IgG humano marcado com avidina-biotina. Neste ensaio também foram utilizadas tiras de antígeno LV-Tcra como controle. Na revelação dos “pool” com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina não foi identificado nenhum peptídeo nos “pool” de LCR; enquanto que no antígeno LV-Tcra foram identificados os peptídeos de 30 e 67kDa. O antígeno LV-Tcra foi obtido a partir do crescimento das larvas em peritônio de camundongo, o que pode fazer com que ocorra reconhecimento do conjugado anti-IgG de camundongo. Na revelação com o conjugado anti-IgG humano marcado com avidina-biotina nos três “pool” foram identificados os peptídeos de 43 e 40kDa, demonstrando que o conjugado anti-IgG humano reage com a imunoglobulinas presentes na amostras de LCR devido provavelmente a quebra das cadeias leve e pesadas das imunoglobulinas após o tratamento com o tampão de amostra Dom dTT e fervura (**figura 22**).

Figura 22: Blot de três "pool" (P1, P2, P3) de LCR de pacientes com NC em fase ativa utilizando como conjugado anti-IgG humano marcado com biotina/avidina-peroxidase (A) e anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina (B). Controle tiras de antígeno LV-Tcra (C). À esquerda padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

5. IMUNOBLOT COM ANTÍGENO LV-Tcra PURIFICADO COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ES-Tcra

O extrato antigênico LV-Tcra purificado com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi separado em SDS-PAGE e aplicado em diferentes concentrações variando de 0,1µg/mm, e em ng/mm de 20, 10, 5 e 1. Após a transferência, as membranas foram ensaiadas para detecção de antígenos nas diferentes concentrações. Para tanto foi empregado o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e a reação foi revelada com conjugado imunoglobulina de cabra anti-IgG de camundongo marcada com fosfatase alcalina e solução substrato-cromógeno NBT-BCIP. Na **figura 23** são mostrados estes resultado em que pode-se observar reatividade com os peptídeos de 14 e 18kDa em todas as concentrações de antigênicas, sendo esta reatividade mais evidente até a concentração de 5ng. Na concentração de 0,1µg, também houve reatividade com o peptídeo de 30kDa, o que não foi observado nas demais concentrações.

Também foi empregado como conjugado o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado/avidina-peroxidase e a reação foi revelada com solução por quimioluminescência. Na **figura 24** são mostrados os resultados desta reação em que pode-se observar reatividade com os peptídeos de 14 e 18kDa para as concentrações de 50, 10 e 5ng, enquanto que para a concentração de 1ng não foi observada reatividade.

Figura 23: Imunoblot do antígeno LV-Tcra purificado com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e separado em SDS-PAGE em diferentes concentrações: 0,1 μ g (**tira 1**), 20ng (**tira 2**), 10ng (**tira 3**), 5ng (**tira 4**) 1ng (**tira 5**) ensaiadas como anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina. À esquerda padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

Figura 24: Imunoblot do antígeno LV-Tcra purificado com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e separado em SDS-PAGE em diferentes concentrações: 50ng (**tira 1**), 10ng (**tira 2**), 5ng (**tira 3**) e 1ng (**tira 4**) ensaiadas como anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado/avidina-peroxidase e a reação foi revelada por quimioluminescência. À esquerda padrão de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4kDa).

Discussão

No estudo da NC, alguns autores têm utilizado a pesquisa de antígenos e sua caracterização (TELLEZ-GIRON et al., 1989; CHOROMANSKI et al., 1990; SAKO & ITO, 2001; CORREA et al., 1989; CORREA et al., 1999; GARCIA et al., 2000; GARCIA et al., 2002; ERHART et al., 2002; ZOLI et al., 2003). Mais recentemente, nosso grupo vem padronizando a detecção de antígenos de cisticercos em LCR utilizando anticorpos policlonais (PARDINI et al., 2001) e monoclonais (ESPÍNDOLA et al., 2002).

O antígeno heterólogo de *T. crassiceps* (FREEMAN, 1962) vem sendo estudado como fonte alternativa para a obtenção de antígenos devido a reatividade cruzada observada entre as duas espécies de *Taenia*, o que sugere a utilização do antígeno heterólogo em testes imunológicos, mostrando-se um antígeno promissor também para estudos epidemiológicos, e modelo experimental para o entendimento da complexa relação parasita-hospedeiro, já que as duas espécies de *Taenia* – *T. solium* e *T. crassiceps*, compartilham antígenos imunodominantes (LARRALDE et al. 1990; VAZ, 1993; VAZ et al. 1997; BUENO et al., 2000; ESPÍNDOLA et al., 2000; PARDINI et al., 2002; PERALTA et al., 2002; BRAGAZZA et al., 2002; ISHIDA, 2003; ESPÍNDOLA, 2004).

O diagnóstico da NC é difícil de ser realizado devido aos sintomas polimórficos, semelhantes a outras afecções do SNC, não podendo ser diagnosticada clinicamente através de observações devido à semelhança com outros distúrbios neurológicos. Técnicas como a TC e os ensaios ELISA para pesquisa de anticorpo são muito empregadas, mas o diagnóstico definitivo também pode ser realizado pela identificação de antígenos após biópsia (ESTRADA et al., 1989; GARCIA et al., 1991; NEVES, 2000).

Recentemente, autores vem destacando a importância dos testes para pesquisa de antígenos, já que os testes para a pesquisa de anticorpos não possibilitam a detecção precoce da NC. A pesquisa de antígenos torna-se importante ferramenta também para o acompanhamento de indivíduos

tratados (GARCIA et al., 2000; GARCIA et al., 2002; ERHART et al., 2002; ZOLI et al., 2003; DORNY et al., 2003). A identificação de antígenos relevantes e a sua purificação poderão auxiliar na padronização de técnicas para a sua detecção, bem como para auxiliar a elucidação dos mecanismos imupatogênicos.

Este trabalho teve como objetivo a padronização do teste ELISA para a pesquisa de antígenos utilizando soros policlonais e anticorpos monoclonais. O teste imunoblot foi empregado para a caracterização de antígenos encontrados em algumas amostras de LCR.

Obtenção dos Antígenos

Para a pesquisa de antígenos em amostras de LCR de pacientes com NC foram empregados anticorpos policlonais e monoclonais obtidos por imunização dos animais com cisticercos de *T. solium* (policlonal) e de *T. crassiceps* (poli e monoclonal). Também foi utilizado o antígeno ES-Tcra para a obtenção de anticorpos monoclonais.

Os extratos antigênicos T-Tso, LV-Tcra e ES-Tcra foram submetidos às condições redutoras em SDS-PAGE mini-gel 15%. O padrão de peptídeos para os antígenos T-Tso e LV-Tcra foram caracterizados quando o gel foi corado pelo Comassie Blue, apresentando composição complexa. No antígeno T-Tso, foram identificadas frações com peso molecular de 100 a 14kDa (94, 67, 48, 43, 37, 30, 22, 18, 14–10kDa). No antígeno LV-Tcra foram identificadas frações de peso molecular de 94 a 14-10kDa (94, 72, 67, 48, 33, 22, 18, 14–10kDa), sendo os peptídeos de baixo peso molecular 18 e 10kDa identificados com maior intensidade (**fig. 1**). No antígeno ES-Tcra foram identificados os peptídeos 18 e 14kDa após 24h de cultivo das larvas, uma maior intensidade de reatividade foi observada na coleta de 48h, e ausente nos dois dias seguintes (VAZ et al.; 1997a; BUENO et al., 2000; ESPÍNDOLA et al., 2000b).

Como era esperado, a menor concentração de peptídeos de baixo peso molecular verificada no antígeno T-Tso decorre da própria forma de

obtenção deste antígeno, já que em sua preparação há grande perda do líquido vesicular na qual os peptídeos de peso molecular <20kDa são encontrados em maior proporção, enquanto que no extrato antigênico LV-Tcra foram identificados peptídeos com maior concentração de frações entre 18 e 14kDa com maior intensidade, devido a utilização do líquido vesicular.

Obtenção dos Soros Policlonais e Purificação

A partir dos resultados obtidos com os soros imunes por ELISA foi determinada a sangria total dos animais no 45ºd para os animais imunizados com os antígenos T-Tso e LV-Tcra, já que estes apresentavam resposta imune intensa para os respectivos antígenos. Para os coelhos imunizados com o antígeno Tcra<30kDa, a sangria foi determinada no 60ºd, devido a menor resposta observada no 45ºd (**fig. 2 e 3**).

Os soros imunes anti-Tso, anti-Tcra e anti-Tcra<30kDa foram fracionados para obtenção da fração IgG. Realizando-se a eletroforese dos soros imunes e de suas respectivas frações IgG, verificou-se elevado rendimento e bom desempenho do fracionamento, que foi cerca de 95% para todas as frações, portanto, o rendimento de IgG para a fração IgG anti-Tso foi de 6,3mg; para a fração IgG anti-Tcra foi de 17,8mg e para a fração IgG anti-Tcra<30kDa foi de 19mg.

Após o fracionamento, foi realizada a caracterização da especificidade dos anticorpos – reatividade homóloga e heteróloga das frações IgG. A partir dos resultados obtidos para a titulação em bloco das frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa determinou-se o título das mesmas para seu emprego na pesquisa de antígenos. Observou-se que a reatividade homóloga sempre foi maior com o respectivo antígeno empregado no teste. A menor intensidade de reatividade homóloga e heteróloga da fração IgG anti-Tcra<30kDa comparada as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra não era esperada. Provavelmente, a composição do inóculo do antígeno Tcra<30kDa, eluato de SDS-PAGE,

incluía SDS e talvez a acrilamida, pôde ter reduzido a imunogenicidade ou até aumentado a sua toxicidade para células imunocompetentes do coelho imunizado (BUENO et al., 2001). Por outro lado, nos ensaios ELISA utilizados para análise da fração IgG anti-Tcra<30kDa, foram empregados os antígenos T-Tso e LV-Tcra que possuem composição antigênica mais complexa, ou seja, apenas parte dos antígenos eram peptídeos com peso molecular inferior a 30kDa. A tentativa de obter anticorpos <30kDa foi devido à constatação que no antígeno LV-Tcra a maior reatividade ocorre com os peptídeos de baixo peso molecular, portanto mais imunogênicos. Embora esse soro tenha tido baixo rendimento, apresentou elevada especificidade para a pesquisa de antígeno em LCR (**fig. 14**) (PARDINI et al., 2002).

As frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa foram ensaiadas por imunoblot com os extratos antigênicos T-Tso e LV-Tcra, para caracterizar a especificidade dos anticorpos em cada fração.

Para as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra ensaiadas com os antígenos T-Tso e LV-Tcra foram identificados os peptídeos com peso molecular variando de 94 a 14-10kDa, enquanto que para a fração IgG anti-Tcra<30kDa, estes peptídeos foram mais fracamente identificados. A reatividade homóloga também no imunoblot foi mais intensa quando as frações foram ensaiadas com seus respectivos antígenos (**fig. 12**).

Os peptídeos de 18 e 14-10kDa de LV-Tcra e o peptídeo de 12kDa de T-Tso foram identificados pelo anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra (**fig. 13**). No controle da reação (**1**), incubado apenas com diluente da amostra, foi observado coloração inespecífica dos peptídeos 25 e 45kDa do antígeno LV-Tcra, o que não era esperado já que era utilizado um anticorpo monoclonal (**fig. 11**). É possível que variações com o lote do antígeno LV-Tcra, ou mesmo o tratamento utilizado, possa ter introduzido alguma alteração na composição protéica do antígeno. A melhor possibilidade é que no antígeno LV-Tcra haja componentes protéicos do camundongo (que foi hospedeiro do cisticerco fonte do antígeno) e daí o conjugado anti-IgG de camundongo tenha se ligado a estes peptídeos.

Imunoblot com antígeno LV-Tcra purificado com anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra

A partir da análise do teste imunoblot com o antígeno ES-Tcra separado em SDS-PAGE em diferentes concentrações (100 a 1ng) revelado com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com a enzima fosfatase alcalina, houve reatividade para os peptídeos de 14 e 18kDa em todas as concentrações até a concentração de 1ng (**fig. 23**).

O antígeno ES-Tcra também foi separado em SDS-PAGE nas concentrações de 50, 10, 5 e 1ng e analisado por imunoblot por técnica de quimiluminescência. O anticorpo monoclonal empregado no teste foi o monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado/avidina-peroxidase. Para nossa surpresa, apesar do emprego de uma técnica mais sensível para a detecção de proteínas, como a quimiluminescência, a reatividade com o antígeno ES-Tcra foi menor com detecção até de 5ng (**fig. 24**).

Ao contrário de nossos resultados, também empregando a técnica de imunoblot, ESTRADA et al., 1989, identificaram peptídeos de alto peso molecular – 190 e 230kDa, em 14 de 18 amostras de LCR de pacientes com suspeita de NC, empregando soro policlonal de coelho anti-*T. solium* e “pool” de soro de pacientes com NC. Os antígenos identificados nas amostras de LCR corresponderam aos antígenos com mesmo peso molecular detectados no líquido vesicular do cisto.

TELLEZ-GIRON et al., 1989, com o teste imunoblot utilizando IgG purificada de soro policlonal de coelho imunizado com antígeno de *T. solium*, os autores identificaram uma proteína de 66kDa nas amostras de LCR de pacientes com NC.

Com a técnica de HPLC, CHOROMAMANSKI et al., 1990, realizaram o fracionamento de amostras de LCR de pacientes com suspeita de NC. Os pesquisadores identificaram em 44 das 79 amostras analisadas uma fração de aproximadamente 110kDa (pico 2), caracterizado por imunoblot.

Teste ELISA para pesquisa de antígenos em amostras de LCR de com os Anticorpos Policlonais

Para as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa a diluição escolhida foi de 1:100, 1:500 e 1:50 respectivamente para a padronização da pesquisa de antígenos em LCR. Nos ensaios, foi observada maior reatividade para os pacientes do grupo NC comparado aos outros grupo C e grupo OP (**fig. 14 e 16; tabela 2; ANEXOS I, II, VI e VII**). Apesar disso, foi necessária a escolha de *cut-off* relativamente altos, 0,68; 0,48 e 0,81, respectivamente para as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa. A partir dos *cut-off* determinados, foi realizado o calculo do índice de reatividade (IR), sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram IR maior ou igual a 1.

As frações obtidas a partir do antígeno heterólogo de *T. crassiceps* – IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa mostraram-se mais sensíveis e específicas para a detecção dos antígenos nas amostras de LCR de pacientes com cisticercose por ELISA comparada a fração IgG anti-Tso. Para as 12 amostras (30%) do grupo NC que não apresentaram reatividade com a fração IgG anti-Tso a intensidade de leitura variou de 0,300 – 0,600, com IR variando de 0,4 – 0,8, e cinco amostras mostraram IR próximas ao *cut-off* (1,0). Para o grupo controle nove amostras (18%) foram reagentes com a fração IgG anti-Tso. Com a fração IgG anti-Tcra sete amostras (17,5%) do grupo NC foram negativas, enquanto que uma amostra do grupo Controle apresentou positividade. Já com a fração IgG anti-Tcra<30kDa uma amostra do grupo NC (4,2%) não foi reagente, enquanto que nas amostras do grupo Controle nenhuma amostra foi reagente. Com os resultados das amostras de LCR dos pacientes do grupo NC e grupo Controle (**fig. 14 e 16; tabela 2; ANEXOS I, II, VI e VII**), obteve-se sensibilidade de 70%, 82,5% e 95,8% e especificidade de 82,5%, 98% e 100%, respectivamente para as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa; com concordância de 87,5% entre os testes.

Nossos resultados apresentaram maior sensibilidade com o emprego das frações heterólogas IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa comparados aos encontrados pelos pesquisadores VELASCO-CASTREJÓN et al., 1989, que com o emprego de partículas de látex sensibilizadas com imunoglobulinas de coelho anti-líquido vesicular, anti-excreção/secreção e anti-extrato total de *T. solium* detectaram antígenos de *T. solium* em 88% de 250 LCR de pacientes com NC, enquanto que em nosso ensaio com a fração IgG anti-Tcra<30kDa, a sensibilidade apresentada pelo teste ELISA foi de 95,8% e especificidade de 100%.

Soros policlonais anti-*T. solium* têm sido utilizados para a detecção de antígenos em amostras de LCR de paciente com NC. TELLEZ-GIRON et al., 1987, empregando a técnica de dot-ELISA detectaram antígenos em 10 de 17 (59%) amostras de LCR de pacientes com NC. Por ELISA 13 das 17 amostras (77%) também apresentaram reatividade. Em outro trabalho, TELLEZ-GIRON et al., 1989, demonstraram que 59% e 77% de 17 amostras de LCR de paciente com NC continham antígenos, utilizando, respectivamente, as técnicas de Dot-ELISA e ELISA. A especificidade para ambos os métodos foi de 100%, quando ensaiadas com 48 amostras de pacientes com outras desordens neurológicas. Apesar do emprego de uma técnica econômica (Dot-ELISA), os pesquisadores ressaltam a importância da padronização de um teste ELISA, já que em alguns casos a visualização e definição dos “dots” foi mais difícil.

Para a detecção de antígenos em amostras de pacientes em diferentes fases evolutivas da doença (**fig. 15, tabela 2; ANEXO III**), foi observada praticamente a mesma reatividade com as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra. Para as amostras do tipo III e misto, os antígenos foram identificados em 100% das amostras com as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra, enquanto que com as amostras do tipo IV três (23%) de 13 amostras apresentaram resultado negativo com a fração IgG anti-Tso e uma (8%) dessas amostras também foi negativa com a fração IgG anti-Tcra.

Quando analisamos os resultados do teste ELISA para a pesquisa de antígenos nas amostras do tipo III com as frações IgG anti-Tso e IgG anti-

Tcra, observamos que em duas amostras (amostras 4 e 5) houve o aumento do número de células e proteína, caracterizando processo inflamatório. Nenhuma amostra do grupo apresentou alteração de hemácias. Estas duas amostras também apresentaram a maior reatividade para a pesquisa de antígenos, sendo que na amostra de número quatro ocorreu maior alteração dos índices citoprotéicos e também maior reatividade para a pesquisa de antígenos com ambas as frações. As outras amostras do grupo, não apresentaram valores citoprotéicos alterados, no entanto, os índices de reatividade para a pesquisa de antígenos variaram de 0,9 – 2,0 com os dois anticorpos empregados no teste. Neste grupo de amostras caracterizado por cistos encontrados em processo inflamatório e/ou em degeneração, pudemos observar que em apenas uma amostra houve o aumento de células e proteínas, o que também pode ter contribuído para a maior reatividade para a pesquisa de antígenos dessa amostra. Nas demais amostras do grupo, as frações empregadas no teste foram capazes de detectar antígenos independentemente da presença ou ausência de processo inflamatório. Estes resultados sugerem que o teste para a pesquisa de antígenos possa ser empregado em amostras que apresentam alterações em seus índices citoprotéicos e também naquele grupo de amostras que não apresentam alterações. É importante ressaltar, que todas as amostras também foram positivas para a pesquisa de anticorpos com os antígenos T-Tso e LV-Tcra, e novamente nas amostras 4 e 5 também houve maior detecção de anticorpos com ambos os antígenos.

Para as amostras do tipo IV, em que são encontrados cistos em calcificação, cinco amostras (amostras 17, 18, 22, 23 e 24) apresentaram maiores variações nos índices citoprotéicos, e uma amostra (amostra 18) apresentou alteração de hemácias. Estas amostras também apresentaram maior reatividade comparadas as demais do grupo para a pesquisa de antígenos, enquanto que para a pesquisa de anticorpos e antígenos foi observada maior reatividade para as amostras 17, 22 e 24. Neste grupo, a reatividade para a pesquisa de antígenos com as duas frações empregadas nos testes foi menor comparada aos grupos com imagem do tipo III e misto,

o que já era esperado já que nas amostras do grupo IV são encontrados cistos em calcificação. Neste grupo também, três amostras (amostras 19, 20 e 21) não apresentaram reatividade para a pesquisa de antígenos com a fração IgG anti-Tso, mas duas amostras apresentaram D.O. muito próximas ao limiar de reatividade e uma destas três amostras não apresentou reatividade com a fração IgG anti-Tcra. Para estas três amostras não reagentes para a pesquisa de antígenos, os índices citoprotéicos eram pouco alterados. Outros autores também relataram menor sensibilidade na detecção de antígenos em amostras de pacientes com NC na fase de calcificação (ESTRADA et al., 1989; GARCIA et al., 2002).

No grupo de amostras do tipo misto, em que são encontrados mais de um tipo de imagem, cinco amostras (amostras 25, 29, 30, 34 e 39) apresentaram alterações citoprotéicas, das quais duas amostras (amostras 34 e 39) apresentaram maior reatividade para a pesquisa de antígenos, comparadas ao grupo. Nas outras amostras, antígenos puderam ser detectados sem alteração nos índices citoprotéicos.

A reatividade encontrada para a pesquisa de antígenos empregando-se as duas frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra neste grupo, compara-se a reatividade observada para as amostras do tipo III (processo inflamatório e/ou em degeneração), pois nos dois grupos – grupo III e IV antígenos foram detectados em 100% das amostras.

Com os resultados obtidos, foi possível realizar a detecção de antígenos em amostras de diferentes grupos e também nas amostras que apresentavam ou não alterações citoprotéicas. A avaliação do teste em um maior número de amostras é necessária para verificar se há correlação entre os resultados da pesquisa de antígenos com a fase evolutiva do parasita ou com o processo imune inflamatório do hospedeiro.

A pesquisa de antígenos também foi empregada para o acompanhamento de pacientes em fase ativa de cisticercose que após um mês de tratamento com albendazol, três das sete amostras analisadas não apresentaram mais positividade para a pesquisa de antígenos circulantes, resultado confirmado também pela TC (ZOLI et al., 2003).

Teste ELISA com anticorpo monoclonal

Ao analisarmos as 21 amostras de LCR de pacientes em fase ativa da doença ensaiadas para a pesquisa de antígenos com a fração IgG anti-Tcra, 13 amostras (61,9%) foram reagentes, enquanto que com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra obtivemos maior reatividade, 16 (76,2%) das 21 amostras foram positivas para a pesquisa de antígenos (**fig. 16 e ANEXO IV**). Para as 17 amostras do grupo OP, ensaiadas com a fração IgG anti-Tcra duas amostras (11,7%) (neurossífilis e criptococose) apresentaram reatividade, e cinco amostras (29,4%) quando ensaiadas com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foram positivas (meningoencefalite, neurossífilis, duas amostras de pacientes com meningite viral e criptococose) (**fig. 16 e ANEXO IX**).

Para as 22 amostras de LCR do grupo Controle ensaiadas por ELISA com os anticorpos nenhuma amostra apresentou reatividade com ambos os anticorpos (**fig. 16 e ANEXO VIII**). Com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi possível realizar a detecção de antígenos em um número maior de amostras de pacientes em fase ativa da doença comparada a fração IgG anti-Tcra.

Com relação ao nosso trabalho, foram ensaiadas 17 amostras de LCR de pacientes com outras patologias para verificação da reatividade cruzada com os anticorpos poli e monoclonal. Para o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra por ELISA foi observada reatividade cruzada com duas amostras de LCR de pacientes com meningite, mas com leitura muito próximo do *cut-off* do teste de 0,31 e IR de 1 (IR 1,00 e 1,23), das outras três amostras que também foram positivas uma de meningo encefalite (IR 1,90), duas amostras uma de neurossífilis (IR 1,42), e criptococose (1,87) também foram reagentes com a fração IgG anti-Tcra (1,39 e 1,20, respectivamente).

As amostras do grupo OP que apresentaram reatividade no teste ELISA com os anticorpos IgG anti-Tcra e anti-ES-Tcra foram ensaiadas por imunoblot, e não foi observada reatividade em nenhuma amostra para os peptídeos de 14 e 18kDa.

Antígenos de *Cryptococcus neoformans* têm sido descritos como componentes de cápsula (HAMILTON et al., 1991; HAMILTON et al., 1992; HAMILTON & GOODLEY, 1993). Os antígenos capsulares foram identificados como polissacarídeos, polímeros de xilose, manose e ácido glucurônico, livres de nitrogênio e enxofre. Os polissacarídeos da cápsula de *C. neoformans* desempenham grande papel na virulência do fungo (LACAZ et al., 2002). Como o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra reconhece glicoproteínas do antígeno LV-Tcra, uma possibilidade a ser investigada é a reatividade cruzada com os antígenos capsulares, o que foi evidenciado pelo teste ELISA utilizando esse antígeno e nosso anticorpo monoclonal. No imunoblot com o antígeno total do fungo não foi observada reatividade do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, o que era esperado pois os antígenos da cápsula não se apresentam no SDS-PAGE (dados não apresentados). Um número maior de casos de criptococose devem ser analisados.

Com a combinação de soro policlonal e anticorpo monoclonal anti-*T. saginata*, CORREA et al., 1989, verificaram que a sensibilidade para a detecção de antígenos em 31 amostras de LCR por ELISA chegou a 93%. Os autores não relataram estudos de reatividade-cruzada com outras parasitoses.

Diferente de nossos resultados, CHANG-YUAN et al., 1992, avaliaram a detecção de antígenos circulantes em 116 amostras de LCR de pacientes com NC e também em 40 amostras de LCR de pacientes com outras desordens neurológicas com o anticorpo monoclonal anti-*T. solium*, o teste detectou antígenos em 95 (81,9%) das 116 amostras ensaiadas, não sendo observada reatividade cruzada.

Em estudo realizado em Hanoi, Viet Nam, ERHART et al., 2002, detectaram antígenos em 34 das 36 amostras de LCR de pacientes com cisticercose. Também neste trabalho, os autores não relatam reatividade cruzada com amostras de outras parasitoses.

Outros autores usando anticorpo monoclonal anti-*T. saginata*, também observaram inespecificidade. GARCIA et al., 2000, avaliaram a detecção de antígenos por ELISA com anticorpo monoclonal anti-*T. saginata* em

amostras de LCR de pacientes tratados com albendazol. O teste apresentou sensibilidade de 85% especificidade 92% (23/25) quando ensaiado em amostras do grupo controle.

Quando analisamos os resultados do teste ELISA para a pesquisa de antígenos nas 68 amostras do grupo “Suspeito” NC (**tabela 2, fig. 16, ANEXO V**), trinta e três amostras com LCR citoprotéico alterado e anticorpo anti-*T. solium* positivo, dessas 33 amostras, 27 (82%) foram reagentes para pesquisa de antígenos, enquanto que em sete amostras estes não foram detectados. Com a fração IgG anti-Tcra 13 amostras (39,4%), e com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra 26 amostras (78,8%) foram reagentes e os testes apresentaram 36,4% de copositividade. Oito amostras apresentavam positividade muito próximo ao *cut-off* para a pesquisa de anticorpo e foram reagentes para a pesquisa de antígenos, sendo três dessas oito amostras positivas com a fração IgG anti-Tcra e sete reagentes com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. Uma amostra apresentou intensa reatividade para a pesquisa de antígenos com os dois anticorpos, e índice de células e/ou proteínas muito alterado, sugerindo tratar-se de um processo inflamatório. Nessa amostra também foi detectada presença de peptídeos 14 e 18kDa no imunoblot com os dois anticorpos.

Ainda no grupo “suspeito” NC, seis amostras com citoprotéico alterado, apresentando reatividade para a pesquisa de anticorpo (IR 1,4 – 6,0) não foram reagentes para a pesquisa de antígenos com os dois anticorpos empregados em nossos testes. No entanto, em outras 15 amostras também positivas para a pesquisa de anticorpos com IR variando de 1,9 – 8,7, independente da alteração citoprotéica, houve a detecção de antígenos com os dois anticorpos pelo teste ELISA. Comparando-se as seis amostras negativas para a pesquisa de antígenos e as 15 amostras positivas para a pesquisa de antígenos, mas em todas as 21 amostras com anticorpo positivo anti-*T. solium*, o IR para pesquisa de anticorpo foi maior para a maioria das 15 amostras positivas para a pesquisa de antígenos, assim como, o aumento da variação citoprotéica.

Das 68 amostras do grupo “suspeito” NC – 11 amostras com LCR citoprotéico alterado e pesquisa de anticorpos negativa ou inconclusiva quando ensaiadas para a pesquisa de antígenos, três (27,3%) foram positivas com a fração IgG anti-Tcra enquanto que oito (72,7%) foram positivas com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, com copositividade entre os testes de 27,3%. Três amostras não apresentaram reatividade para a pesquisa de antígenos, sendo que nestas três amostras os índices citoprotéicos eram pouco alterados. Para as outras oito amostras reativas com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, quatro apresentaram reatividade alta para a pesquisa de antígeno com IR de 2,23, 2,97, 2,13 e 1,81; enquanto que com a fração IgG anti-Tcra houve copositividade em três amostras com reatividade de 1,67, 1,03 e 1,34. Nas outras quatro amostras positivas com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, a detecção de antígenos foi muito próxima ou igual ao *cut-off* de 0,31 e IR 1 (1,35, 1,03, 1,00 e 1,06), sugerindo provavelmente reatividade inespecífica já que em três das quatro amostras não houve detecção de antígenos também com a fração IgG anti-Tcra.

Também foram ensaiadas neste grupo “suspeito” NC, 17 amostras com LCR citoprotéico “normal” mas com anticorpo anti-*T. solium* positivo, e sete destas 17 amostras apresentaram índice de reatividade de anticorpos próximo ao limiar de reatividade. Para estas amostras, houve detecção de antígenos pela fração IgG anti-Tcra e com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra em 3 (17,6%) amostras. Outras duas amostras que também foram positivas para a pesquisa de antígenos com um ou outro anticorpo, apresentavam índice de reatividade para a pesquisa de anticorpos próximos ao *cut-off*, e foi observada positividade com a fração IgG anti-Tcra também próxima ao *cut-off* da reação, e para a outra amostra o mesmo ocorreu com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. Para as outras 12 amostras antígeno negativo, sete apresentavam alta reatividade para a pesquisa de anticorpos, enquanto que em cinco amostras esta reatividade era próxima do *cut-off*. Nessas sete amostras não podemos descartar a possibilidade de formação

de imunocomplexos e falsa-negatividade nos testes para a pesquisa de antígenos.

Foram classificadas como amostras do grupo “suspeito” NC, sete amostras com LCR citoprotéico “normal” e apresentavam negatividade ou índice inconclusivo para a pesquisa de anticorpos anti-*T. solium*. Quando foram ensaiadas para a pesquisa de antígenos, nenhuma amostra apresentou reatividade.

De maneira geral, o padrão de reatividade para a pesquisa de antígenos com os anticorpos utilizados em nosso teste variou também de acordo com a presença de anticorpos, além das alterações de proteína e/ou células e hemácias, que as amostras apresentavam.

Nas amostras que apresentaram maior intensidade de reação para a pesquisa de anticorpos, também foi observada maior intensidade do IR para a pesquisa de antígenos. A intensidade de leitura quando as amostras foram reagentes na pesquisa de antígenos com os dois anticorpos, também foi semelhante. No entanto, o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra mostrou maior concordância quando comparado a detecção de anticorpos nestas amostras, sendo detectados antígenos em 30 amostras que também tinham reatividade para anticorpos acima $IR \geq 1,9$, sugerindo fortemente que estas eram amostras positivas para cisticercose.

Para o outro grupo de 17 amostras LCR citoprotéico “normal” mas que apresentavam pesquisa de anticorpo positivo, com algumas leituras próximo ao limiar de reatividade, foram detectados antígenos em quatro amostras com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, três amostras apresentaram leitura próximo ao *cut-off*, mesmo que em duas amostras a reatividade para a pesquisa de anticorpos tenha sido alta. Com a fração IgG anti-Tcra, duas amostras também apresentaram leitura no limiar, concordando com duas amostras positivas com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra.

Já no grupo de amostras LCR citoprotéico “normal” e que apresentavam anticorpo inconclusivo ou negativo, não houve detecção de antígenos pelos dois anticorpos. Também é importante ressaltar, que o IR apresentado neste grupo de amostras variou para a fração IgG anti-Tcra de

0,20 – 0,32, e para o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra a maior leitura chegou a 0,91.

Os resultados observados neste grupo “suspeito” para NC sugerem que para a realização da pesquisa de antígeno em amostras “suspeitas” para NC, os níveis alterados de células e proteínas (citoprotéico alterado) provavelmente interferiram no teste. Para as amostras “suspeitas”, em que há discordância entre os resultados da pesquisa de anticorpos e da pesquisa de antígenos, uma outra alternativa proposta é o emprego do teste imunoblot para caracterização do padrão de peptídeos encontrados nestas amostras, comparando-os com os peptídeos encontrados nas amostras NC. No entanto, não podemos deixar de ressaltar, que o emprego do teste imunoblot para a pesquisa de antígenos é bastante trabalhoso e talvez não seja exequível para análise de todas as amostras, devido também ao volume das amostras de LCR coletado, podendo este ser insuficiente até para a repetição do próprio teste ELISA impossibilitando portanto, o emprego da análise por imunoblot em rotina laboratorial.

A análise de resultados dos testes para detecção de anticorpos juntamente com os resultados da pesquisa de antígenos talvez possa auxiliar a elucidar os casos de “suspeita” de NC, e se possível, comparar também com os resultados de imagem, eliminando a possibilidade da doença ou de reatividade cruzada com outras doenças que atinjam o SNC, além da inespecificidade como observamos em algumas amostras, devido provavelmente a alteração dos índices citoprotéicos, que em nossos testes apresentaram-se como possíveis fatores interferentes.

Outro resultado que nos chamou a atenção, foi a não detecção de antígenos pelos anticorpos empregados em nossos testes em seis amostras de LCR que foram reagentes para a pesquisa de anticorpos, com índice de reatividade variando entre 1,4 – 6,0, além da menor variação para os índices de citoprotéicos. Os resultados podem sugerir a formação de imunocomplexos bloqueando antígenos eventualmente presentes. Uma possibilidade de verificarmos esta interferência seria a realização do tratamento das amostras de LCR com agentes dissociantes, agindo na

interação antígeno–anticorpo, e talvez aumentando a chance da detecção de antígenos no teste ELISA. O volume das amostras de LCR acabam muitas vezes inviabilizando a tentativa de novos ensaios para a verificação e confirmação dos resultados.

ELISA Competição com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra e amostras de LCR de pacientes com NC

Com os resultados obtidos no teste ELISA de competição com oito amostras de LCR de pacientes com NC e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra biotinilado/avidina-peroxidase, verificamos que houve competição em todas as oito amostras (**fig. 17**), mas com índice de competição (IC) diferente para cada amostra. Para seis amostras o IC variou de 70% - 92%, sendo que para duas das seis amostras o IC passou de 80%; enquanto que duas outras amostras apresentaram IC em torno de 60% - 70%. A variação do IC observado em nosso experimento era esperada, já que inicialmente havia sido fixada a concentração de antígeno ES-Tcra adsorvido à placa e também a diluição do anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra empregado no teste. Devido provavelmente as diferentes concentrações de antígenos nas amostras e também considerando-se a diferente composição destes antígenos, as amostras apresentaram IC diferentes. Nas amostras em que houve maior IC – 84,2% e 92,45%, os resultados sugerem maior concentração de antígenos e também a possibilidade do reconhecimento dos antígenos de peso molecular <20kDa, já que no teste empregou-se o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra que apresenta maior especificidade para os peptídeos de 14 e 18kDa.

ELISA sanduíche utilizando a fração IgG anti-Tcra

Para o teste ELISA sanduíche a placa foi sensibilizada com a fração IgG anti-Tcra, e após foi adicionado o antígeno LV-Tcra e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, como conjugado empregamos a anti-IgG de mouse absorvido com células sensibilizadas com anti-IgG de coelho imune (fração IgG anti-Tcra). Conforme apresentado na **fig. 19**, pudemos observar que quanto maior a concentração de antígeno LV-Tcra na solução, melhor foi o desempenho do teste ELISA do tipo sanduíche para a detecção dos antígenos presentes na solução, com limite de detecção até 0,01 μ g.

Realizamos também o ensaio de ELISA sanduíche com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra adsorvido a placa, mas a fração IgG anti-Tcra apresentou melhor desempenho no teste, pois a reatividade com o controle de conjugado era alta com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. É importante lembrar que o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra foi obtido a partir de ascite realizada em camundongo e foi purificada com a Proteína A que tem afinidade por IgG, mas esta purificação pode fazer com que todas as IgG presentes na ascite estejam sendo purificadas, inclusive a IgG normal do camundongo.

Para o emprego de amostras de LCR de pacientes com NC no modelo de teste ELISA sanduíche, encontraremos imunoglobulinas presentes nas amostras, o que não foi encontrado quando utilizamos somente o antígeno LV-Tcra diluído em diferentes concentrações na solução empregado na padronização do nosso teste sanduíche, não havendo este tipo de interferência no teste realizado. Com a utilização de conjugados anti-IgG de camundongo ou de coelho pode haver reação parcial com a IgG de outras espécies, isto é, anti-IgG (conjugado) pode reconhecer a IgG normal presente nas amostras de LCR dos pacientes, diminuindo a sensibilidade e a especificidade do teste. Os modelos de teste que utilizam como conjugado a anti-IgG de camundongo ou de coelho,

poderão apresentar reatividade de fundo, observada em nossos ensaios já que poderão reconhecer também a IgG normal presente no LCR.

O emprego do teste do tipo sanduíche para a detecção de antígenos nas amostras de LCR, depende ainda de uma melhor padronização. Uma possibilidade a ser estudada é o uso da fração Fab de anticorpos monoclonais obtidos por expansão em meio de cultura.

Caracterização dos antígenos detectados nas amostras de líquido cefalorraquiano por imunoblot

O teste imunoblot foi empregado em nosso trabalho para caracterizarmos os antígenos encontrados nas amostras de LCR. Inicialmente, foram ensaiadas com as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra duas amostras do grupo NC e duas amostras do grupo C, em que peptídeo de 34kDa foi considerado inespecífico devido a identificação também nas amostras do grupo C (**fig. 20**). Os peptídeos de 14 e 18kDa responsáveis pela reatividade cruzada entre as duas espécies de *Taenia* e específicos para o diagnóstico da cisticercose (BUENO et al., 2000; ESPÍNDOLA et al., 2000; PARDINI et al., 2002; PERALTA et al., 2002; ESPÍNDOLA et al., 2002) foram fortemente identificados nas amostras de LCR de pacientes do grupo NC com as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra.

Também foram ensaiadas por imunoblot com a fração IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, 20 amostras de LCR de pacientes em fase ativa da doença. Com a fração IgG anti-Tcra em uma amostra (3,6%) o peptídeo de 14kDa foi fortemente identificado, enquanto que em duas amostras (amostras 13 e 14) o peptídeo de 18kDa foi identificado mais fracamente. Quando as mesmas amostras foram ensaiadas com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, em sete amostras o peptídeo de 14kDa foi identificado (**fig. 21**).

Ao contrário de nossos resultados, outros autores descreveram a detecção de peptídeos de alto peso molecular utilizando soro anti-Tso. TELLEZ-GIRON et al., 1989, caracterizaram antígeno circulante, uma proteína de 66kD em amostras de LCR. ESTRADA et al., 1989, identificaram dois antígenos de 190 e 230kD em 14/18 amostras de LCR de pacientes com suspeita de NC, e no antígeno líquido vesicular do cisticercos. CHOROMANSKI et al., 1990, utilizando HPLC identificaram antígenos de 110kD e > 400kD em amostras de LCR.

Empregando-se as frações IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra no teste imunoblot nas amostras de LCR de pacientes com NC, pacientes em fase ativa e em amostras do grupo Controle os peptídeos acima de 30kDa foram identificados e considerados inespecíficos já que foram identificados nas amostras do grupo Controle. Quando as amostras de LCR de fase ativa da NC foram novamente ensaiadas por imunoblot e empregado o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, para a nossa surpresa os peptídeos de 43kDa – 67kDa também foram reconhecidos e identificados pelo anticorpo monoclonal.

Um novo ensaio foi realizado em que selecionamos três amostras do grupo NC e duas amostras do grupo Controle que foram tratadas com células de *Staphylococcus aureus*, cepa Cowan I, e depois aplicadas no gel de SDS-PAGE, e realizado o teste imunoblot com a fração IgG anti-Tcra e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. Mesmo com o tratamento, os peptídeos de 43kDa continuaram sendo identificados. Neste ensaio, também realizamos como controle da reação, uma tira com a célula (*Staphylococcus aureus*) puro e diluído a 1:2 em PBS, e também nestes controles o peptídeo de 43kDa foi reconhecido. Em sua superfície, o *Staphylococcus aureus* apresenta a proteína A que possui peso molecular de 43kDa, e de acordo com os resultados encontradas nas amostras de LCR positivas e negativas para NC tratadas com as células, e nos controles, a identificação do peptídeo de 43kDa pode indicar que no tratamento das amostras ainda houvesse a presença de proteína A que acabou ligando os anticorpos policlonais ou monoclonais. Outra

possibilidade que deve ser investigada é a utilização de células preparadas mais recentemente, diminuindo a possibilidade de encontrarmos no sobrenadante das amostras tratadas com as células os produtos de lise da própria célula que podem ter causado interferência no teste.

Como as amostras de LCR são tratadas com tampão de amostra com dTT e fervidas durante 5 minutos antes de serem aplicadas ao SDS-PAGE, este tratamento pode provocar a quebra de cadeias leve (25kDa) e pesadas (50 – 70kDa) da imunoglobulinas presentes nas amostras de LCR e que portanto, acabam sendo identificadas pelos anticorpos empregados em nosso teste. Mesmo o tratamento das amostras com as células de *Staphylococcus aureus*, não modificou estes resultados, sugerindo que para o bom desempenho do teste imunoblot, estes interferentes ainda devem ser analisados para a melhor padronização do teste.

Nove amostras do grupo “suspeito” NC com LCR citoprotéico alterado e anticorpo positivo, também foram ensaiadas por imunoblot para a fração IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. Quando comparamos os resultados do teste ELISA para pesquisa de antígenos com o resultado do teste imunoblot (mesmo que o ensaio tenha sido realizado em um número reduzido de amostras), em três amostras foram caracterizados os peptídeos de 18 e 14kDa com os dois anticorpos. Nas outras 6 amostras com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra o peptídeo de 18kDa foi identificado, enquanto que com a fração IgG anti-Tcra apenas duas das 5 amostras apresentaram reatividade com o mesmo peptídeo. O anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra mostrou-se mais eficiente na detecção dos peptídeos de 18 e 14kDa, enquanto que a fração IgG anti-Tcra não detectou peptídeos em 4 amostras. Uma das amostras ensaiadas por imunoblot também apresentou reatividade no teste ELISA apenas o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra. Neste grupo de amostras, o peptídeo de 43kDa também foi detectado e considerado inespecífico.

Para verificarmos a reatividade inespecífica dos conjugados empregados em nossos testes com as imunoglobulinas presentes nas amostras de LCR, três “pool” de LCR (P1, P2, P3) de pacientes com NC em fase ativa foram ensaiados por imunoblot. Como controle empregamos tiras de antígeno LV-Tcra. Com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina não observamos a marcação de nenhuma banda nas amostras de LCR, enquanto que na tira controle do antígeno LV-Tcra foram identificados os peptídeos de 30 e 67kDa. A reatividade do conjugado anti-IgG de camundongo com o antígeno LV-Tcra poderá ter ocorrido pelo fato dos cisticercos de *T. crassiceps* terem sido mantidos em peritônio de camundongos e o antígeno LV de *T. crassiceps* é obtido a partir dos cisticercos retirados do animais. Com o conjugado anti-IgG humana marcada com avidina-biotina, não houve reconhecimento de peptídeos no antígeno LV-Tcra, mas o conjugado reagiu com as imunoglobulinas presentes em dois “pool” (P1 e P2) com maior intensidade para o peptídeo de 43kDa (**fig. 22**).

A reatividade encontrada no teste imunoblot com o conjugado anti-IgG humano para o peptídeo de 43kDa também foi observada nas amostras de LCR ensaiadas com as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, sugerindo que o tratamento que as amostras de LCR sofrem antes de serem aplicadas no gel podem quebrar as imunoglobulinas presentes nas amostras e que por fim, são identificadas pelos anticorpos e conjugados empregados nos testes e são consideradas de reatividade inespecífica pelo teste imunoblot, já que os peptídeos de alto peso molecular foram encontrados também nas amostras do grupo C (**fig. 20, 21 e 22**).

Diferentes fatores podem estar relacionados ao desempenho dos testes para a pesquisa de antígenos, tais como, o emprego de amostras de pacientes em diferentes fases evolutivas da doença que pode nos auxiliar no esclarecimento da diversidade ou não dos antígenos liberados no LCR e se detectados, poderão ajudar na escolha do melhor anticorpo para ser empregado no teste, já que a baixa sensibilidade dos testes pode estar

relacionada ao emprego de um anticorpo que não reconheça os antígenos presentes na amostra, devido a presença de antígenos desconhecidos, ou ainda, à baixa concentração desses antígenos na amostra e até a própria degradação antigênica que estes antígenos podem sofrer.

CONCLUSÕES

- As frações obtidas a partir do antígeno heterólogo LV-Tcra e ES-Tcra – policlonais IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa e anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra mostraram-se mais sensíveis e específicas para a detecção dos antígenos nas amostras de LCR de pacientes com NC do que a fração IgG anti-Tso. Obteve-se sensibilidade de 70%, 82,5% e 95,8% e especificidade de 82,5%, 98% e 100%, respectivamente para as frações IgG anti-Tso, IgG anti-Tcra e IgG anti-Tcra<30kDa.
- As amostras de pacientes em fase ativa da doença mostraram maior intensidade de reatividade com o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra, comparada a fração IgG anti-Tcra.
- Com o teste imunoblot os peptídeos de 14 e 18kDa foram identificados em amostras LCR de pacientes com NC, utilizando a fração IgG anti-Tcra e o anticorpo monoclonal anti-ES-Tcra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAGAZZA, L. M., VAZ, A. J., PASSOS, A. D. C., TAKAYANAGUI, M., NAKAMURA, P. M., ESPÍNDOLA, N. M., PARDINI, A. X. AND BUENO, E. C. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural Brazilian community (Cássia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, São Paulo, v.44, n.4, p.7-12, 2002.
- BRANDT, J. R. A., GEERTS, S., DE DEKEN, R., KUMAR V., CELEUMANS, F., BRIJS, L., FALLA, N. A monoclonal antibody-based ELISA the detection of circulation excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v.22, n.4, p.471-477, 1992.
- BUENO, E. C., VAZ, A. J., MACHADO, L. R., LIVRAMENTO, J. A., MIELLE, S. R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples, *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.38, n.1, p.146-151, 2000.
- BUENO, E. C., VAZ, A. J., MACHADO, L. R., LIVRAMENTO, J. A., ÁVILA, S. L. M., FERREIRA, A. W. Antigens-specific suppression of culture lymphocytes from patients with neurocysticercosis. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.126, p.304-310, 2001.
- CANTÚ, C., BARINAGARREMENTERIA, F. Cerebrovascular Complications of neurocysticercosis, *Arch. Neurol.*, México, v.53, p.233-239, 1996.
- CARPIO, A. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect. Dis.*, v.2, p.751-762, 2002.

De acordo com a norma NBR6023/00 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BARSILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 2002.

- CHANG-YUAN, W., HONG-HUA, Z., LING-YUN, GE. A mab-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. *Hybrydoma*, New York, v.11, n.6, p.825-827, 1992.
- CHOROMANSKI, L., ESTRADA, J. J., KUHN, R. E. Detection of antigens of larval *Taenia solium* in 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., YUN, D. H., EOM K. S., KANG, S. Y., KONG, Y., CHO, S. Y. *Taenia solium*: identification of specific antibody binding regions of metacestode 10-kDa protein. *Experim. Parasitol.*, v.100, p.87-94, 2002.
- 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 Laeidsensia*, Leiden, v.57, n.2, p.93-99, 1989.
- CORREA, D., SARTI, E., TAPIA-ROMERO, R., RICO, R., ALCÁNTARA-ANGUIANO, I., SALGADO, A. VALDEZ, L., FLISSER, A. Antigens and antibodies in sera from human cases of epilepsy or taeniasis from area of Mexico where *Taenia solium* cysticercosis is endemic. *Annals Trop. Med. Parasitol.*, London, v.93, n.1, p.69-74, 1999.
- DEL BRUTTO, O. H., RAJSHEKHAR, V., WHITE Jr., A. C., TSANG, V. C. W., NASH, T. E., TAKAYANAGUI, O. M., SCHANTZ, P. M., EVANS, C. A. W., FLISSER, A., CORREA, D., BOTERO, D., ALLAN, J. C., SARTI, E., GONZALEZ, A. E., GILMAN, R. H., GARCÍA, H. H. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurol.*, v.57, p.177-183, 2001.
- 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., AND THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP OF PERU. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.46, p.610-615, 1992.

- DORNY, P., BRANDT, J., ZOLI, A., GEERTS, S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis., *Acta Tropica*, Amsterdam, v.87, p.79-86, 2003.
- 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, 1995.
- D'SOUZA, P. E., HAFEEZ, M. D. Detection of *Taenia solium* cysticercosis in pigs by ELISA with an excretory-secretory antigen. *Vet. Res. Communi.*, Dordrecht, v. 23, n. 5, p.293-298, 1999.
- ERHART, A., DORNY, P., VAN DE, N., VIEN, H. V., THACH, D. C., TOAN, N. D., CONG, L. D., GEERTS, S., SPEYBROECK, N., BERKVEN, D., BRANDT, J. *Taenia solium* cysticercosis in a village in northern Viet Nam: sero-prevalence study using an ELISA for detecting circulating antigen. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.96, p.270-272, 2002.
- ESPÍNDOLA, N. M., DE GASPARI, E. N., NAKAMURA, P. M., VAZ, A. J. Production of monoclonal antibodies anti-*Taenia crassiceps* cysticerci with cross-reactivity with *Taenia solium* antigens. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, São Paulo, v.42 n.3 p.175-177, 2000.
- ESPÍNDOLA, N. M., VAZ, A. J., PARDINI, A. X., FERNANDES, I. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, London, v.96, n.4, p.361-368, 2002.
- ESPÍNDOLA, N. M. – Caracterização de Antígenos de Cisticercos e sua Aplicação para o Diagnóstico da Cisticercose Humana. São Paulo, 2004 (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

- 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, 1986.
- 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. Hyg.*, Baltimore, v.41, n.1, p.50-55, 1989.
- 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, A. P., VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., SASAKI, A. T., FERREIRA, A. W., LIVRAMENTO, J. A. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, São Paulo, v. 39, n.1, p.29-33, 1997.
- FLISSER, A., SARTI, E., LIGHTOWLERS, M., SCHANTZ, P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop.*, Amsterdam, v.87, p.43-51, 2003.
- FREEMAN, R. S. Studies of the biology of *Taenia crassiceps*. *Can. J. Zool.*, Ottawa, v.40, p.969-990, 1962.
- GARCIA, H. H., MARTINEZ, M., GILMAN, R., HERRERA, G., TSANG, V. C. W., PILCHER, J. B., DIAZ, F., VERASTEGUI, M., GALLO, C., PORRAS, M., ALVARADO, M., NARANJO, J., MIRANDA, E., AND THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions, *Lancet*, London, v.338, p.549-551, 1991.

- GARCIA, H. H., GILMAN, R. H., CATACORA, M., VERASTEGUI, M., GONZALES, A. E., TSANG, C. V. W. AND THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Serologic Evolution of Neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. *J. Infect. Dis.*, v.157, p.486-489, 1997.
- GARCIA, H. H., EVANS, C. A. W., NASH, T. E., TAKAYANAGUI, O. M., WHITE JR, A. C., BOTERO, D., RAJSHEKHAR, V., TSANG, V. C. W., SCHANTZ, P. M., ALLAN, J. C., FLISSER, A., CORREA, D., SARTI, E., FRIEDLAND, J. S., MARTINEZ, S. M., GONZALEZ, A. E., GILMAN, R. H., DEL BRUTTO, O. H. Current consensus guidelines for treatment of Neurocysticercosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.15, n.4, p.747-756, 2002a.
- GARCIA, H. H., PARKHOUSE, R. M. E., GILMAN, R. H., MONTENEGRO, T., BERNAL, T., MARTINEZ, S. M., GONZALEZ, A. E., TSANG, V. C. W., HARRISON, L. J. S., AND THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.94, p.673-676, 2000b.
- GARCIA, H. H., GONZALEZ, A. E., GILMAN, R. H., BERNAL, T., RODRIGUEZ, S., PRETELL, E. J., AZCURRA, O., PARKHOUSE, R. M. E., TSANG, V. C. W., HARRISON, L. J. S., AND THE CYSTICERCOSIS WORK GROUP IN PERU. Circulating parasite antigen in patients with hydrocephalus secondary to neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.66, n.4, p.427-430, 2002.
- GARCIA, H. H., GONZALES, A. E., EVANS, A. W., GILMAN, R. H. FOR THE CYSTICERCOSIS WORK GROUP IN PERU. *Lancet*, v.361, p.574-556, 2003.
- GREENE, R. M., WILKINS, P. P., TSANG, V. C. W. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-kDa subunits. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.99, p.257-261, 1999.

- HAMILTON, A. J., BARTHOLOMEW, M. A., FIGUEROA, J., FENELON, L. E., HAY, R. J. Production of species-specific murine monoclonal antibodies against *Cryptococcus neoformans* which recognize a noncapsular exoantigen. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.29, n.5, p.980-984, 1991.
- HAMILTON, A. J., JEAUVONS, L., HOBBY, P., HAY, R. A 34- to 38-kilodalton *Cryptococcus neoformans* glycoprotein produced as an exoantigen bearing a glycosylated species-specific epitope. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.60, n.1, p.143-149, 1991.
- HAMILTON, A. J., GOODLEY, J. Purification of 115-kilodalton exoantigen *Cryptococcus neoformans* and its recognition by immune sera. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.31, n.2, p.143-149, 1993.
- HARRISON, L. J. S., JOSHUA, G. W. P., WRIGHT, S. H., PARKHOUSE, R. M. E. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.*, Oxford, v.11, p. 351-370, 1989.
- HUBERT, K., ANDRANTSIMAHAVANDY, A., MICHAULT, A., FROSCH, M., MÜHLSCHLEGEL, F. A. Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticerci. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, Washington, v.6, n.4, p.479-482, 1999.
- ISHIDA, M. M. I. – Aplicação de testes imunoenzimáticos (ELISA e immunoblot) para diagnóstico da cisticercose em amostras séricas humanas de diferentes grupos de população do Estado de Santa Catarina e perfil de reatividade homóloga e heteróloga de antígenos de *Taenia* sp e de outros agentes parasitário antigenicamente relacionados. São Paulo, 2003 (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

- 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. 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., KANAZAWA, T., MARGONO, S. S. ELISA and immunoblot using purified glycoproteins for serodiagnosis of cysticercosis in pigs naturally infected with *Taenia solium*. *J. Helm.*, v.73, p.363-365, 1999.
- ITO, A., YAMASAKI, H., NAKAO, M., SAKO, Y., OKAMOTO, M., SATO, M. O., NAKAYA, K., MARGONO, S. S., IKEJIMA, T., KASSUKU, A. A., AFONSO, S. M. S., ORTIZ, W. B., PLANCARTE, A., ZOLI, A., GEERTS, S., CRAIG, P. S. Multiple genotypes of *Taenia solium* – ramifications for diagnosis, treatment and control. *Acta Trop.*, Amsterdam, v.87, p.95-101, 2003.
- JOSHI, D. D., POUDYAL, P. M., JIMBA, M., MISHRA, P. N., NEAVE, L. A., MAHARJAN, M. Controlling *Taenia solium* in Nepal using the precede-preceed model. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, Bankog,, v.32, n.2, 94-97, 2001.
- KUNZ, J., KALINNA, B., WATSCHKE, V., GEYER, E. *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentrabl. Bakteriol.*, Stuttgart, v.271, p.510-520, 1989.
- LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C. Tratado de Micologia Médica, ed. Sarvier, p.417, 2002.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, p.680-685, 1970.

- LANGE, O. Síndrome líquórica da cisticercose encéfalo-meningea. *Rev. De Neurologia e Psiquiatria de São Paulo*, São Paulo, v.6, n.2, p.35-48, 1940.
- LARRALDE, C., MONTOYA, R. M., SCIUTTO, E., DIAZ, M. L., GOVEZENSKY, T., COLTORTI, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.40, n. 3, p.282-290, 1989.
- LARRALDE, C., SOTELO, J., MONTOYA, R. M., PALENCIA, G., PADILLA, A., GOVEZINSKY, T., DIAZ, M. L., SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.114, p.926-928, 1990.
- LIVRAMENTO, J. A. Contribuição de reação de imunofluorescência no líquido cefalorraquiano ao estudo da neurocisticercose. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v.39, p.261-278, 1981.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. 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.*, Stuttgart, v.43, p.201-202, 1992.
- MACEDO, H. W., PERALTA, R. H. S., CIPRIANO, A., SARMENTO, M. R., VAZ, A. J., PERALTA, J. M. Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v.38, n.2, p.93-103, 2002.
- MACHADO, L., R. Líquido cefalorraquiano e neurocisticercose. *Arq. Neuro-psiq.*, v.45, n.4., p.353-363, 1987.

- MACHADO, L. R., NOBREGA, J. P. S., BARROS, N. G., LIVRAMENTO, J. A., BACHESCHI, L. A., SPINA-FRANÇA, A. Computed tomography in neurocysticercosis. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo, v.48, n.4, p. 414-418, 1990.
- MARGONO, S. S., SUBAHAR, R., HAMID, A., WANDRA, T., SUDEWI, S. S. R., SUTISNA, P., ITO, A. Cysticercosis in Indonesia: epidemiological aspects. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, Bankog, v.32, n.2, p.79-84, 2001.
- McMANUS, D. P. Molecular technology: improving strategies for controlling hydatid disease and cysticercosis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, Bankog, v.21, n.2, p.161-173, 1990.
- McKINNEY, M. M., PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Methods*, v.96, p.271-278, 1987.
- MOLINARI, J. L., GARCÍA-MENDONZA, E., LA GARZA, Y. DE, RAMÍREZ, J. A., SOTELO, TATO, P. Discrimination between active and inactive neurocysticercosis by metacestode excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an enzyme-linked immunosorbent assay *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.66, n.6, p.777-781, 2002.
- MONTENEGRO, T. C., MIRANDA, E. A., GLIMAN, R., AND THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU Production of monoclonal antibodies for the identification of the eggs of *Taenia solium*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, London, v.90, n.2, p.145-155, 1996.
- MOSES, A. Dos metodos biologicos de diagnostico nas cisticercozes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.3, p.322-326, 1911.
- NEVES, D. N. Teníase e Cisticercose. In: NEVES, D. P. Parasitologia Humana, 2000, p.207-215.

- NIETO, C. Cysticercosis of the central nervous system. Diagnosis by means of spinal fluid complement fixation test. *Neurology*, Minneapolis, v.6, p.725, 1956.
- PAMMENTER, M. D., ROSSOUW, E. J. The value of an antigenic fraction of *Cysticercus cellulosae* in the serodiagnosis of cysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, London, v.81, n.2, p.117-123, 1987.
- PARDINI, A. X., VAZ, A. J., MACHADO, L. R. AND LIVRAMENTO, J. A. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 39, n.9, p.3368-3372, 2001.
- PARDINI, A. X., PERALTA, R. H., VAZ, A. J., MACHADO, L. R., PERALTA, J. M. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington, v.9, n.1, p.190-193, 2002.
- PERALTA, R. H. S., VAZ, A. J., PARDINI, A. X., MACEDO, H. W., MACHADO, L. R., DE SIMONE, S. G., PERALTA, J. M. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the diagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop.*, Amsterdam, v.38, n.2, p.159-168, 2002.
- PLANCARTE, A., FEXAS, M., FLISSER, A. Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Inter. J. Parasitol.*, Oxford, v.24, n.5, p.733-738, 1994.
- PLANCARTE, A., HIROTA, C., MARTÍNEZ-OCAÑA, J., MENDONZA-HERNÁNDEZ, G., ZENTENO, E., FLISSER, A. Characterization of GP39-42 and GP24 antigens from *Taenia solium* cysticerci and their antigenic GP10 subunit. *Parasitol Res.*, v.85, p.680-684, 1999.

- RESTREPO, B. I., OBREGÓN-HENAO, A., MESA, M., GIL, D. L., ORTIZ, B. L., MEJÍA, J. S., VILLOTA, G. E., SANZÓN, F. TEALE, J. M. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *Inter. J. Parasitol.*, Lawrence, v.30, p.689-696, 2000.
- REY, L. Parasitologia – Parasitas e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África In: REY, L. 3 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
- RODRIGUEZ-CANUL, R., ALLAN, J. C., FLETES, C., SUTISNA, I. P., KAPTI, I. N., CRIAG, S. P. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v.4, n.5, p.579-582, 1997.
- RODRIGUEZ-DEL-ROSAL, E., CORREA, D., FLISSER, A. Swine cysticercosis: detection of parasite products in serum. *Vet. Record.*, London, v.124, p.488, 1989.
- ROMÁN, G., SOTELO, J., DEL BRUTTO, O., FLISSER, A., DUMAS, M., WADIA, N., BOTERO, D., CRUZ, M., GARCIA, H., DE BITTENCOURT, P. R. M., TRELLES, L., ARRIAGADA, C., LORENZANA, P., NASH, T. E., SPINA-FRANÇA, A. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bulletin of the World Health Organization*, v.78, n.3, 2000.
- SAKO, Y., ITO, A. Recent advances in serodiagnosis for cysticercosis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, Bankog, vol.32, supl.2, 2001.
- SARTI, E., RAJSHEKHAR, V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Tropica*. v.87, p.137-143, 2003.

- SCHANTZ, P., TSANG, V. C. W. The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and research and control cysticercosis. *Acta Tropica*. v.87, p.161-163, 2003.
- SCIUTTO, E., HERNÁNDEZ, M., GARCÍA, G., ALUJA, A. S., VILLALOBOS, A. N. M., RODARTE, L. F., PARKHOUSE, M., HARRISON, L. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.78, p.185-194, 1998.
- SCIUTTO, E., FRAGOSO, G., FLEURY, A., LACLETTE, J. P., SOTELO, J., ALUJA, A., VARGAS, L., LARRALDE, C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection*, p.1875-1890, 2000.
- SOTELO, J., GUERRERO, V., RUBIO, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Arch. Intern. Med.*, Chicago, v.145, p.442-445, 1985.
- TELLEZ-GIRON, E., RAMOS, M. C., DUFOUR, 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, p.169-173, 1987.
- TELLEZ-GIRON, E., RAMOS, M. C., ALVAREZ, P., DUFOUR, L., MONTANTE, M. Detection and characterization of antigens from *Taenia solium* cysticercus in cerebrospinal fluid. *Acta Leidensia*, Leiden, v.57, n.2, p.101-105, 1989.
- TSANG, V. C. W., BRAND, J. A., BOYER, A. E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.159, n.1, p.50-59, 1989.

- TSANG, V. C. W. , WILSON, M. *Taenia solium* cysticercosis: an under-recognized but serious public health problem. *Parasitol. Today*, v.11, n.3, p.124-126, 1995.
- 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.*, n.80, v.6, p.931-936, 1994.
- VALESCO-CASTREJÓN, O., GUTIÉRREZ-QUIROZ, M., ROMERO, V., GUZMÁN-BRANCHO, C. Detección de antígenos solubles de *Cysticercus cellulosae* en líquido cefalorraquídeo como medio diagnóstico en neurocisticercosis. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, México, v.31, p.235-239, 1989.
- VAN KERCHOVEN, I., VANSTEENKISTE, W., CLAES, M., GEERTS, BRANDT, J. Improved detection of circulating antigen incattle infected with *Taenia saginata* metacesodes. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.76, p.269-274, 1998.
- VAZ, A. J. - *Cysticercus longicollis*: caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano na neurocisticercose humana. São Paulo, 1993 (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- VAZ, A. J., LIVRAMENTO, J. A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A. W. & AVILA, S. L. M. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.
- VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., CAMARGO, M. E., CAMARGO, E. D., FERREIRA, A. W. Dot-ELISA for detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in human cerebrospinal fluid samples using a new solid-phase (resin-treated polyester fabrics) and *Cysticercus longicollis* antigens. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.38, n.6, p.391-396, 1996.

- VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., BARRETO, C. C., FERREIRA, A. W., LIVRAMENTO, J. A. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: use of heterologous antigenic particles (*Cysticercus longicollis*) in indirect immunofluorescence test. *Serodiagn. Immunol.. Infec. Dis.*, v.8, p.157-161, 1997(a).
- VAZ, A. J., NUNES, C. M., PIAZZA, R. M. F., LIVRAMENTO, J. A., SILVA, M. V., NAKAMURA, P. M., FERREIRA, A. W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.57, n.3, p.354-357, 1997(b).
- WHITE, Jr., A. C. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin. Infect. Dis.*, v.24, p.101-115, 1997.
- ZOLI, A. P., ONGOLO-ZOGO, P., DORNY, P., BRANDT, J., GEERTS S. Follow-up of Neurocysticercosis patients after treatment using an antigen detection ELISA. *Parasite*, v.10, p.65-68, 2003.

ANEXO I: DADOS E RESULTADOS GERAIS DAS 40 AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES DO GRUPO NEUROCISTICERCOSE ENSAIADAS COM AS FRAÇÕES IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra (em negrito amostras reagentes)

Amostra	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tso	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tso	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra
	Cut-off: 0,68	IR: 1,00	Cut-off: 0,48	IR: 1,00
1	0,39	0,57	0,26	0,54
2	0,53	0,78	0,39	0,81
3	0,28	0,41	0,30	0,63
4	0,58	0,85	0,59	1,23
5	1,20	1,76	0,81	1,69
6	1,23	1,81	1,06	2,21
7	0,73	1,07	0,58	1,21
8	0,25	0,37	0,22	0,46
9	0,39	0,57	0,21	0,44
10	0,79	1,16	0,83	1,73
11	0,55	0,81	0,56	1,17
12	0,02	0,03	0,91	1,90
13	1,01	1,49	0,72	1,50
14	0,61	0,90	0,64	1,33
15	1,18	1,74	0,91	1,90
16	1,50	2,21	1,00	2,08
17	2,76	4,06	1,95	4,06
18	3,27	4,81	1,85	3,85
19	1,99	2,93	0,93	1,94
20	2,38	3,50	1,69	3,52
21	2,89	4,25	2,34	4,88
22	2,46	3,62	1,41	2,94
23	1,07	1,57	0,86	1,79
24	1,29	1,90	1,27	2,65
25	0,32	0,47	0,15	0,31
26	0,27	0,40	0,28	0,58
27	1,07	1,57	0,69	1,44
28	1,16	1,71	1,05	2,19
29	0,57	0,84	0,51	1,06
30	0,96	1,41	0,96	2,00
31	2,10	3,09	1,12	2,33
32	0,72	1,06	0,73	1,52
33	1,12	1,65	1,02	2,13
34	1,05	1,54	0,94	1,96
35	1,69	2,49	3,51	7,31
36	1,27	1,87	1,06	2,21
37	2,13	3,13	1,60	3,33

38	2,84	4,18	2,01	4,19
39	3,42	5,03	2,73	5,69
40	1,31	1,93	1,04	2,17
Média	1,28		1,04	
Desvio Padrão	0,85		0,66	

Legenda:**IR:** índice de reatividade

ANEXO II: DADOS E RESULTADOS GERAIS DAS 24 AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES DO GRUPO NEUROCISTICERCOSE ENSAIADAS COM A FRAÇÃO IgG anti-Tcra<30kDa (em negrito amostras reagentes)

Amostra	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra<30kDa	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra<30kDa
	ELISA Cut-off 0,81	ELISA IR: 1,00
1	2,68	3,31
2	1,02	1,26
3	2,06	2,54
4	0,76	0,94
5	3,00	3,70
6	2,83	3,49
7	2,43	3,00
8	1,42	1,75
9	2,87	3,54
10	3,15	3,89
11	3,28	4,05
12	2,70	3,33
13	0,91	1,12
14	1,08	1,33
15	1,12	1,38
16	1,26	1,56
17	1,28	1,58
18	1,96	2,42
19	2,64	3,26
20	1,51	1,86
21	2,38	2,94
22	1,51	1,86
23	2,29	2,83
24	1,31	1,62
		162
Média	1,98	
Desvio Padrão	0,72	

Legenda:

IR: índice de reatividade

ANEXO III: DADOS E RESULTADOS GERAIS DAS 40 AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES DO GRUPO NEUROCISTICERCOSE COM RESULTADOS DE IMAGEM ENSAIADAS COM AS FRAÇÕES IgG anti-Tso e IgG anti-Tcra (em negrito amostras reagentes)

Amostra	Leucócitos / mm ³	Hemácias /mm ³	Prot totais mg/dL	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tso ELISA <i>Cut-off 0,68</i>	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tso ELISA IR: 1,00	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra ELISA <i>Cut-off 0,48</i>	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra ELISA IR: 1,00
TIPO III							
1	1,7	0	38	0,90	1,32	1,03	2,15
9	1,0	0	28	1,70	2,50	2,30	4,79
3	1,0	0	46	1,65	2,43	1,96	4,08
4	47	0	88	2,49	3,66	2,02	4,21
5	6,0	0	30	0,97	1,43	1,01	2,10
6	1,0	0	30	1,14	1,68	1,59	3,31
7	1,7	0	18	1,38	2,03	1,87	3,90
8	0,3	0	22	1,48	2,18	1,87	3,90
9	0,3	0	28	1,21	1,78	1,43	2,98
10	0,3	0	28	1,56	2,29	2,18	4,54
11	1,3	0	22	1,53	2,25	1,77	3,69
TIPO IV							
12	0,3	0	32	0,81	1,19	0,91	1,90
13	1,7	0	26	0,84	1,24	0,80	1,67
14	0,7	0	34	1,04	1,53	1,11	2,31
15	1,0	0	34	0,85	1,25	0,95	1,98
16	0,7	0	24	0,77	1,13	0,89	1,85
17	40	0	34	2,00	2,94	1,90	3,96
18	40	190	30	0,90	1,32	1,13	2,35
19	1,0	0	26	0,09	0,13	0,09	0,19
20	0,7	0	29	0,65	0,96	0,76	1,58
21				0,57	0,84	0,74	1,54
22	30	0	40	2,74	4,03	3,23	6,73
23	6,0	0	29	2,02	2,97	2,92	6,08
24	133	0	66	2,00	2,94	2,50	5,21
TIPO MISTO							
25	70	0	76	1,36	2,00	1,38	2,88
26	3,0	0	800	1,45	2,13	1,35	2,81
27	3,3	0	22	1,26	1,85	1,43	2,98
28	2,0	0	40	1,00	1,47	1,10	2,29
29	7,0	0	28	1,54	2,26	1,50	3,13
30	10	0	38	1,13	1,66	1,38	2,88
31	0,3	0	20	0,88	1,29	1,01	2,10
32	5,0	0	28	1,71	2,51	2,27	4,73
33	1,0	0	40	1,61	2,37	2,15	4,48
34	13	0	30	2,09	3,07	2,36	4,92
35	2,0	0	28	0,87	1,28	1,15	2,40
36	1,7	0	20	1,32	1,94	1,37	2,85
37	1,0	0	24	0,96	1,41	1,49	3,10

38	1,7	0	34	2,02	2,97	2,61	5,44
39	7,0	0	34	2,19	3,22	2,33	4,85
40	1,3	0	44	1,90	2,79	2,30	4,79

Legenda:**IR:** índice de reatividade

ANEXO IV: DADOS E RESULTADOS GERAIS DAS 21 AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES DO GRUPO NEUROCISTICERCOSE EM FASE ATIVA DA DOENÇA ENSAIADAS COM A FRAÇÃO IgG anti-Tcra e ANTICORPO MONOCLONAL anti-ES-Tcra (em negrito amostras reagentes)

Amostra	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra	Pesquisa de Ag Com IgG anti-ES-Tcra	Pesquisa de Ag Com IgG anti-ES-Tcra
	ELISA <i>Cut-off</i> 0,38	ELISA IR: 1,00	ELISA <i>Cut-off</i> 0,31	ELISA IR: 1,00
1	0,52	1,37	0,63	2,03
2	0,45	1,18	0,56	1,81
3	0,53	1,39	1,14	3,68
4	0,38	1,00	1,16	3,74
5	0,35	0,92	0,31	1,00
6	0,52	1,37	0,85	2,74
7	0,39	1,03	0,27	0,87
8	0,36	0,95	0,84	2,71
9	0,38	1,00	0,31	1,00
10	0,27	0,71	0,23	0,74
11	0,34	0,89	0,35	1,13
12	0,47	1,24	0,92	2,97
13	0,44	1,16	0,96	3,10
14	0,36	0,95	0,35	1,13
15	0,43	1,13	0,85	2,74
16	0,32	0,84	0,27	0,87
17	0,32	0,84	0,19	0,61
18	0,52	1,37	0,53	1,71
19	0,46	1,21	0,29	0,94
20	0,54	1,42	0,78	2,52
21	0,30	0,79	0,50	1,61

Legenda:

IR: índice de reatividade

ANEXO V: DADOS E RESULTADOS GERAIS DAS 68 AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES DO GRUPO “SUSPEITA” NEUROCISTICERCOSE ENSAIADAS COM A FRAÇÃO IgG anti-Tcra e ANTICORPO MONOCLONAL anti-ES-Tcra (em negrito amostras reagentes)

Amostras com LCR alterado e anticorpo positivo

Amostra	Prot.	Cél.	Hem.	Pesquisa de Ac com Ag Tso ELISA IR	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra ELISA <i>Cut-off</i> 0,38	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra Imunoblot	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra ELISA <i>Cut-off</i> 0,31	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra Imunoblot
1	40	5	1	1,3	0,46	...	0,22	...
2	2020	125	10.080	1,3	0,79	18Rf/14Rf	0,95	18Rf/14Rf
4	143	80	0	5,7	0,65	18Rf/14Rf	0,47	18Rf/14Rf
5	44	10	0	4,3	0,62	18Rf	0,41	18Rf
7	22	44	0	4,4	0,50	18Rf/14Rf	0,49	18Rf/14Rf
8	69	1	0	2,3	0,41	18Rf	0,29	18Rf
10	50	0	0	1,3	0,39	...	0,30	...
11	46	6	1	1,4	0,37	...	0,28	...
12	25	70	165	1,3	0,62	Negativo	0,72	18Rf
13	25	36	23	R	0,35	Negativo	0,50	18Rf
14	32	65	0	8,0	0,69	Negativo	0,84	18Rf
16	17	11	50	3,8	...	...	0,19	...
18	59	120	25	8,3	0,70	Negativo	1,11	18Rf
22	43	2	1	2,5	...	...	0,37	...
23	43	1	7	2,3	...	...	0,23	...
24	41	2	0	5,3	...	...	0,32	...
26	70	3	28.000	2,0	...	...	0,36	...
31	82	760	10	1,2	0,25	...	0,40	...
36	74	33	1	6,3	0,32	...	0,69	...
37	84	7	50	4,7	0,24	...	0,24	...
38	217	2	0	3,8	0,40	...	0,73	...
40	70	95	15	1,3	0,21	...	0,38	...
41	53	7	1	2,0	0,29	...	0,40	...
49	60	355	4	1,2	0,16	...	0,53	...
50	50	57	0	8,7	0,74	...	1,31	...
54	116	100	45	7,8	1,00	...	0,98	...
55	45	1	740	3,2	0,20	...	0,15	...
57	33	25	10	2,7	0,26	...	0,56	...
58	53	1	0	3,7	...	...	0,47	...
59	141	18	0	1,2	0,33	...	0,84	...
60	41	24	870	5,7	0,31	...	0,89	...
63	144	11	5	6,0	0,15	...	0,11	...
68	104	72	66	1,9	0,32	...	0,90	...
Média					0,435		0,534	
Desvio Padrão					0,218		0,304	

Amostras com LCR alterado e anticorpo negativo ou inconclusivo

Amostra	Prot.	Cél.	Hem.	Pesquisa de Ac com Ag Tso ELISA IR	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra ELISA Cut-off 0,38	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra Imunoblot	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra ELISA Cut-off 0,31	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra Imunoblot
3	154	60	3	0,9	0,67	...	0,69	...
19	44	3	0	1,1	...	...	0,20	...
29	54	8	185	0,9	0,39	...	0,42	...
30	130	...	...	INC.	0,51	...	0,92	...
32	36	14	1	0,9	0,24	...	0,32	...
34	42	2	48	0,9	0,24	...	0,30	...
46	141	3	127	1,0	0,35	...	0,29	...
48	141	296	160	1,0	0,37	...	0,66	...
61	49	1	2	0,8	0,23	...	0,22	...
62	109	115	2	0,9	0,32	...	0,56	...
65	60	21	4	0,9	0,17	..	0,33	..
Média					0,347		0,446	
Desvio Padrão					0,151		0,229	

Amostras com LCR "normal" e anticorpo positivo

Amostra	Prot.	Cél.	Hem.	Pesquisa de Ac com Ag Tso ELISA IR	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra ELISA Cut-off 0,38	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra Imunoblot	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra ELISA Cut-off 0,31	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra Imunoblot
6	25	1	0	1,9	0,27	...	0,20	...
9	13	0	1	1,4	0,28	...	0,36	...
15	34	3	0	4,3	0,45	...	0,31	...
17	21	2	0	R	0,16	...	0,21	...
21	189	25	1	6,1	...	...	0,21	...
25	23	2	525	1,3	...	...	0,15	...
28	16	1	1	1,2	...	...	0,25	...
35	21	1	0	1,2	0,40	...	0,17	...
39	36	2	17	3,1	0,16	...	0,14	...
42	30	1	330	1,3	0,14	...	0,15	...
45	25	3	13	1,4	0,18	...	0,16	...
47	19	4	12	2,4	0,18	...	0,21	...
51	27	1	45	5,7	0,23	...	0,22	...
52	18	1	425	7,1	1,27	...	0,77	...
53	11	1	1	5,5	0,23	...	0,22	...
56	32	1	0	1,4	0,22	...	0,21	...
64	4	3	22	3,4	0,19	...	0,20	...
Média					0,311		0,244	
Desvio Padrão					0,289		0,147	

Amostras com LCR "normal" e anticorpo negativo ou inconclusivo

Amostra	Prot.	Cél.	Hem.	Pesquisa de Ac com Ag Tso ELISA IR	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra ELISA Cut-off 0,38	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra Imunoblot	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra ELISA Cut-off 0,31	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra Imunoblot
20	14	4	0	1,1	...	...	0,25	...
27	25	2	3	1,1	...	...	0,28	...
33	34	3	0	0,8	0,18	...	0,18	...
43	23	3	0	0,9	0,13	...	0,20	...
44	32	0	1	1,1	0,14	...	0,14	...
66	26	1	0	0,8	0,17	...	0,19	...
67	20	3	0	0,8	0,16	...	0,182	...
Média					0,157		0,202	
Desvio Padrão					0,020		0,049	

Legenda

Pesquisa Ac com Ag Tso: Pesquisa de anticorpos anti-*T. solium* com antígeno de *T. solium*
(Biolab Diagnóstica S.A.)

IR: índice de reatividade

Prot.: proteínas

Cél.: células

Hem.: hemácias

...: dados não obtidos

**ANEXO VI: DADOS E RESULTADOS GERAIS DAS 50 AMOSTRAS DE LCR DE
PACIENTES DO GRUPO CONTROLE ENSAIADAS COM AS FRAÇÕES IgG anti-Tso e
IgG anti-Tcra (em negrito amostras reagentes)**

Amostra	Prot.	Cél.	Hem.	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tso	Pesquisa de Ag Com IgG anti- Tso	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra
				ELISA <i>Cut-off 0,68</i>	ELISA IR: 1,00	ELISA <i>Cut-off 0,48</i>	ELISA IR: 1,00
1	37	7	1	0,70	1,03	0,39	0,81
2	32	1	...	0,52	0,76	0,32	0,67
3	21	1	0	0,58	0,85	0,24	0,50
4	31	2	0	0,74	1,09	0,34	0,71
5	38	1	0	0,26	0,38	0,02	0,04
6	26	8	0	0,89	1,31	0,27	0,56
7	22	1	18	0,21	0,31	0,04	0,08
8	138	1	0	0,45	0,66	0,06	0,13
9	36	6	0	0,63	0,93	0,36	0,75
10	26	3	1	1,00	1,47	0,58	1,21
11	33	1	1	0,47	0,69	0,20	0,42
12	27	1	105	0,39	0,57	0,12	0,25
13	24	2	1	0,54	0,79	0,29	0,60
14	28	1	0	0,49	0,72	0,23	0,48
15	32	1	0	0,26	0,38	0,16	0,33
16	46	1	0	0,45	0,66	0,19	0,40
17	45	4	0	0,22	0,32	0,05	0,10
18	167	2	0	0,37	0,54	0,20	0,42
19	35	1	1	0,60	0,88	0,32	0,67
20	49	1	0	0,29	0,43	0,12	0,25
21	57	6	0	0,54	0,79	0,29	0,60
22	44	9	17	0,54	0,79	0,40	0,83
23	34	2	0	0,45	0,66	0,11	0,23
24	32	1	0	0,31	0,46	0,12	0,25
25	57	1	0	0,57	0,84	0,33	0,69
26	85	51	2	0,46	0,68	0,28	0,58
27	38	9	0	0,11	0,16	0,31	0,65
28	29	7	3	0,55	0,81	0,30	0,63
29	36	1	31	0,41	0,60	0,16	0,33
30	49	35	0	0,47	0,69	0,23	0,48
31	31	1	0	0,39	0,57	0,19	0,40
32	22	4	0	0,83	1,22	0,43	0,90
33	23	1	0	0,76	1,12	0,36	0,75
34	39	2	0	0,62	0,91	0,26	0,54
35	43	1	25	0,58	0,85	0,35	0,73
36	72	2	0	0,48	0,71	0,31	0,65
37	27	2	0	0,70	1,03	0,35	0,73
38	33	1	0	0,44	0,65	0,15	0,31
39	37	2	0	0,45	0,66	0,20	0,42
40	49	1	5	0,46	0,68	0,27	0,56
41	52	3	8	0,67	0,99	0,34	0,71
42	47	1	0	0,50	0,74	0,32	0,67

43	43	6	0	0,56	0,82	0,30	0,63
44	43	7	0	0,49	0,72	0,30	0,63
45	16	2	0	0,68	1,00	0,33	0,69
46	23	2	0	0,39	0,57	0,21	0,44
47	73	1	26	0,82	1,21	0,35	0,73
48	48	1	1	0,38	0,56	0,24	0,50
49	27	0	0	0,67	0,99	0,37	0,77
50	22	1	0	0,54	0,79	0,34	0,71
Média				0,52		0,26	
Desvio Padrão				0,08		0,11	

Legenda:

IR: índice de reatividade

Prot.: proteínas

Cél.: células

Hem.: hemácias

...: dados não obtidos

ANEXO VII: RESULTADOS DE ELISA DAS 20 AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES DO GRUPO CONTROLE ENSAIADAS COM O FRAÇÃO IgG anti-Tcra<30kDa

Amostra	IgG anti-Tcra<30kDa	IgG anti-Tcra<30kDa
	ELISA	ELISA
	Cut-off 0,81	IR: 1,00
1	0,35	0,43
2	0,48	0,59
3	0,47	0,58
4	0,80	0,99
5	0,30	0,37
6	0,13	0,16
7	0,28	0,35
8	0,35	0,43
9	0,34	0,42
10	0,37	0,46
11	0,29	0,36
12	0,33	0,41
13	0,51	0,63
14	0,31	0,38
15	0,29	0,36
16	0,24	0,30
17	0,41	0,51
18	0,20	0,25
19	0,32	0,40
20	0,48	0,59
Média	0,36	
Desvio padrão	0,142	

**ANEXO VIII: DADOS E RESULTADOS GERAIS DAS 22 AMOSTRAS DE LCR DE
PACIENTES DO GRUPO CONTROLE ENSAIADAS COM A FRAÇÃO IgG anti-Tcra E
ANTICORPO MONOCLONAL anti-ES-Tcra**

Amostra	Prot.	Cél.	Hem.	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcr
				ELISA Cut-off 0,38	ELISA IR: 1,00	ELISA Cut-off 0,31	ELISA IR: 1,00
1	32	1	0	0,32	084	0,25	0,30
2	46	1	0	0,23	061	0,27	0,33
3	45	4	0	0,32	084	0,20	0,25
4	35	1	1	0,31	082	0,18	0,22
5	49	1	0	0,18	047	0,21	0,26
6	57	6	0	0,35	092	0,16	0,20
7	44	9	17	0,35	092	0,24	0,30
8	34	2	0	0,24	063	0,17	0,21
9	32	1	0	0,33	087	0,19	0,23
10	38	9	0	0,15	039	0,12	0,15
11	36	1	31	0,28	074	0,20	0,25
12	49	35	0	0,21	055	0,29	0,36
13	31	1	0	0,21	055	0,19	0,23
14	22	4	0	0,22	058	0,19	0,23
15	23	1	0	0,23	061	0,14	0,17
16	39	2	0	0,25	066	0,15	0,19
17	43	1	25	0,21	055	0,30	0,37
18	72	2	0	0,32	084	0,30	0,37
19	27	2	0	0,16	042	0,24	0,30
20	33	1	0	0,26	068	0,27	0,33
21	37	2	0	0,27	071	0,23	0,28
22	49	1	5	0,28	074	0,19	0,23
Média				0,26		0,21	
Desvio Padrão				0,060		0,052	

Legenda:

IR: índice de reatividade

Prot.: proteínas

Cél.: células

Hem.: hemácias

...: dados não obtidos

ANEXO IX: DADOS E RESULTADOS GERAIS DAS 17 AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES DO GRUPO DE OUTRAS PATOLOGIAS ENSAIADAS COM A FRAÇÃO IgG anti-Tcra e ANTICORPO MONOCLONAL anti-ES-Tcra (em negrito amostras reagentes)

Amostra	Diagnóstico	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra	Pesquisa de Ag com IgG anti-Tcra	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra	Pesquisa de Ag com anti-ES-Tcra
		ELISA <i>Cut-off</i> 0,38	ELISA IR: 1,00	ELISA <i>Cut-off</i> 0,31	ELISA IR: 1,00
1	Neo de Pulmão	0,32	0,84	0,18	0,58
2	Neo de Pulmão	0,32	0,84	0,28	0,90
3	Neo de Mama	0,27	0,71	0,22	0,71
4	Meningo encefalite	0,32	0,84	0,59	1,90
5	Neurossífilis	0,28	0,74	0,22	0,71
6	Neurossífilis	0,53	1,39	0,44	1,42
7	Neurossífilis	0,24	0,63	0,22	0,71
8	HTLV-1	0,26	0,68	0,26	0,84
9	M. Viral	0,26	0,68	0,19	0,61
10	M. Viral	0,24	0,63	0,20	0,65
11	M. Viral	0,19	0,50	0,23	0,74
12	M. Viral	0,28	0,74	0,29	0,94
13	M. Viral	0,20	0,53	0,27	0,87
14	M. Viral	0,30	0,79	0,31	1,00
15	M. Viral	0,18	0,47	0,38	1,23
16	M. Viral	0,26	0,68	0,29	0,94
17	Criptococose	0,46	1,20	0,57	1,87
Média		0,28		0,29	
Desvio padrão		0,080		0,106	

Legenda:

IR: índice de reatividade

Prot.: proteínas

Cél.: células

Hem.: hemácias

...: dados não obtidos

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. *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), dTT 0,014M (Sigma Chem. Co.), e azul de bromofenol 0,1% (Sigma Chem. Co.), em água destilada.
- c. *Gel de separação de 7 a 20%, 16%*: acrilamida 7%, 20%, 15% ou 16% (Sigma Chem. Co.) e bis-acrilamida 0,2% (Sigma Chem. Co.) todos em solução tamponada Tris-HCl 1,5M pH 8,8 com SDS 0,1%.
- d. *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.
- e. *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.
- f. *Solução fixadora*: metanol 40% (Merck SA Indústrias Químicas) e ácido acético 10% (Merck SA Indústrias Químicas) em água destilada.
- g. *Solução corante Coomassie*: Coomassie Brilliant Blue R-250 1% (Sigma Chem. Co.), ácido acético 10% e metanol 45% em água destilada.
- h. *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 (Sigma)

3. Para IMUNOBLOT

- 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 4-cloronaftol*: Tris-HCl 0,1M (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Alemanha).
- d. *Tampão diluente de substrato NBT/BCPI*: uma pastilha (Sigma) em 10mL de água destilada
- e. *Solução tamponada de transferência pH 8,3*: Tris 0,025M, glicina 0,192M e metanol 20% em água destilada.
- f. *Solução corante Ponceau*: Ponceau-S 0,5% I (Sigma Chem. Co.) em água destilada.
- g. *Solução de Lavagem*: PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 (PBS-T).