

IVANILDES SOLANGE DA COSTA BARCELOS

MON  
216.775.121  
32121  
TES/ME

**Imunodiagnóstico da Neurocisticercose Humana pelos Testes  
ELISA e “Western Blotting” Empregando Diferentes  
Preparações Antigênicas de Metacestódeos de *Taenia solium* e de  
*Taenia crassiceps* em Amostras de Líquidos Cefalorraquidianos**

*Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia, como parte das  
exigências do Curso de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas, para  
a obtenção do título de Mestre.*

**DIRBI/UFU**



1000183410

Uberlândia - Minas Gerais

Brasil - 1998

IVANILDES SOLANGE DA COSTA BARCELOS

**Imunodiagnóstico da Neurocisticercose Humana pelos Testes  
ELISA e “Western Blotting” Empregando Diferentes  
Preparações Antigênicas de Metacestódeos de *Taenia solium* e de  
*Taenia crassiceps* em Amostras de Líquidos Cefalorraquidianos**

*Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia, como parte das  
exigências do Curso de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas, para  
a obtenção do título de Mestre.*

Orientadora: Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz  
Co-Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia - Minas Gerais

Brasil - 1998

Trabalho realizado nos Laboratórios de Parasitologia e de Imunologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia.

## *Dedicação*

*Ao meu esposo Assunção Andrade de Barcelos que me incentivou e apoiou em todos os momentos deste trabalho.*

*Aos meus filhos: Hortênsia Costa de Barcelos e os gêmeos: Aurélio Miguel Costa Barcelos e Alexandre Miguel Costa Barcelos que me proporcionam um cotidiano cheio de alegrias.*

## *Mensagem*

*“Se não há efeito sem causa  
Deus é a causa primeira  
Se há ordem e harmonia no Universo  
Deus é o seu fautor  
Como é simples compreendê-lo e curvar-se ao seu poder.”*

*Vitto Santos*

## *Agradecimentos Especiais*

*Ao meu pai Joaquim Miguel Costa "in memoriam" pelo seu exemplo de trabalho e amor pela família.*

*À minha mãe Ozória Maria de Jesus pela sua presença e carinho.*

*Aos meus irmãos: José Osmar da Costa, Irani das Neves Costa Caldas, Amauri da Costa, Ilvani de Fátima Costa Carvalho, Ozório Maurício da Costa e Júnio César Costa, pela felicidade de sermos amigos.*

*À Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, que me orientou na  
realização desta dissertação com profissionalismo e atenção constantes. E também pela sua  
solidariedade e compreensão.*

## *Agradecimentos*

*Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó por ter me apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da UFU de forma tal que me dediquei, ainda mais, visando corresponder aos atributos por ele citados.*

*Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, pela sua disponibilidade e atenção na co-orientação deste trabalho. E também pela utilização de equipamentos e reagentes do laboratório de Imunologia.*

*Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, pela disponibilidade e incentivo.*

*À Deise Aparecida de Oliveira Silva pela dedicação e cooperação com que me auxiliou na realização do teste de "Western Blotting", e cujo profissionalismo e carisma são admiráveis.*

*Ao Prof. Dr. Germano Francisco Biondi, da UNESP de Botucatu, SP, pelo fornecimento de metacestódeos de **Taenia crassiceps** utilizados nesta dissertação.*

*A Profa Ms. Dagmar Diniz Cabral, da disciplina de Parasitologia do Departamento de Patologia da UFU, pelo fornecimento de metacestódeos de **Taenia solium** utilizados nesta dissertação.*

*A todos os professores da Pós-Graduação pelo exemplo de trabalho sério e dedicação.*

*Aos colegas da Pós-Graduação: Kely, Elizabeth, Fabiana, Andréa, Simone, Fátima, Maria Aparecida, Patrícia, Guilherme, Sidiney e Geraldo pela amizade e incentivo.*

*Aos Drs. Marcelo Simão Ferreira e Leandro P. Moura pelo encaminhamento de amostras de líquidos cefalorraquidianos ao Laboratório de Parasitologia da UFU.*

*À Direção Administrativa e à Divisão de Enfermagem do Hospital de Clínicas, pela aprovação do meu afastamento integral, regulamentado pelo Plano Integrado de Capacitação dos Servidores Técnico-Administrativos da UFU.*



*Aos funcionários dos Laboratórios de Parasitologia e de Imunologia  
pela atenção e carinho durante a realização deste trabalho.*

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização  
desta dissertação.*

## RESUMO

A neurocisticercose humana é decorrente do parasitismo de metacestódeos de *Taenia solium* no Sistema Nervoso Central. A dificuldade de obtenção destas larvas para a preparação de extratos antigênicos utilizados na realização de testes imunológicos no diagnóstico da cisticercose humana continua sendo o fator limitante na padronização de novas tecnologias. A busca de extratos antigênicos homólogos e heterólogos alternativos se faz necessário para a aplicação de testes de altas sensibilidade e especificidade. Os objetivos deste trabalho foram: produzir extrato salino total e extrato sulfato duodecil de sódio (SDS) de metacestódeos de *T. solium* e de *Taenia crassiceps*; utilizar o teste ELISA com extrato salino de metacestódeos *T. solium* e padronizar a sua utilização frente ao extrato SDS homólogo e frente aos dois extratos antigênicos heterólogos e padronizar o teste “Western Blotting” frente aos quatro extratos obtidos. O ELISA foi realizado em 84 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), 40 de pacientes com neurocisticercose comprovada e 44 de pacientes com outras alterações neurológicas. O “Western Blotting” foi realizado em 50 amostras de LCR, 40 com neurocisticercose e 10 com outras alterações neurológicas. A sensibilidade do ELISA foi de 100%, 85%, 95% e 87,5% e os índices de especificidade foram: 100%, 97,9%, 97,7 e 100% para os extratos: salino homólogo, salino heterólogo, SDS homólogo e SDS heterólogo respectivamente. Através do “Western Blotting” foram imunodominantes, em ordem decrescente de frequência de reconhecimento, os marcadores antigênicos: 64-68 e 45kDa; 108-114, 92-95, 64-68 e 88kDa; 64-68, 108-114, 77 e 86kDa e 108-114, 88 e 92-95 kDa nos extratos salino homólogo, salino heterólogo, SDS homólogo e SDS heterólogo respectivamente. Concluiu-se que os quatro extratos podem ser utilizados no diagnóstico desta parasitose, ressaltando que os extratos SDS apresentaram concentrações protéicas superiores aos extratos salinos correspondentes, portanto proporcionaram maior rendimento quantitativo dos ensaios.

## SUMMARY

Human neurocysticercosis is caused by *Taenia solium* metacestode infection in the Central Nervous System. The restriction for obtaining these larvae in the preparation of antigenic extracts used in the immunodiagnostic tests for human cysticercosis is a major problem for the standardization of new tests. The investigation of alternative homologous and heterologous antigens is necessary for the development of tests presenting high sensitivity and specificity. The main goal of the present work was to carry out a comparative study of the total saline and sodium dodecyl sulfate (SDS) extracts of *T. solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes. ELISA was initially used with total saline extract from *T. solium* metacestode, and afterward with three other antigen preparations. In addition, Western-blotting was also studied for all antigenic extracts. It was studied 84 cerebrospinal fluid samples (LCR) by ELISA, 40 from patients with neurocysticercosis and 44 patients with other neurological alterations. Western-blotting was performed in 50 LCR samples, 40 from patients with neurocysticercosis and 10 from patients with other neurological diseases. The sensitivity of ELISA was 100%, 85%, 95% and 87.5% and the specificity was 100%, 97.9%, 97.7% and 100%, respectively, for homologous total saline, heterologous total saline, homologous SDS and heterologous SDS extracts. Immunodominant peptides detected by Western-blotting in decreasing percentage of recognition were: 64-68 and 45 kDa for homologous total saline; 108-114, 92-95, 64-68 and 88 kDa for heterologous total saline; 64-68, 108-114, 77 and 86 kDa for homologous SDS; and 108-114, 88 and 92-95 kDa for heterologous SDS antigenic preparation. Taken together, it can be concluded that all antigenic extracts can be used in the diagnosis of human neurocysticercosis, emphasizing that the SDS extracts presented higher protein concentrations than the saline extracts and therefore they provided better yield in the antigenic preparations.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
1.1. Aspectos Morfobiológicos dos Metacestódeos de <i>Taenia solium</i>	03
1.2. Diagnóstico da Cisticercose Humana	05
1.2.1. Classificação Clínica da Cisticercose Humana	05
1.2.2. Epidemiologia da Cisticercose Humana	06
1.2.3. Biópsias, Imagens e Necropsias na Identificação da Cisticercose Humana	07
1.2.4. Testes Imunológicos Utilizados na Detecção de Anticorpos Anti-Metacestódeos de <i>T. solium</i>	08
1.2.4.a. Metacestódeos de <i>Taenia crassiceps</i> como Fonte Heteróloga de Antígenos para o Diagnóstico da Cisticercose Humana	21
1.2.4.b. Utilização do SDS para Extração de Antígenos	23
1.2.4.c. Tecnologia Molecular no Diagnóstico da Cisticercose Humana	23
1.2.5. Interpretação do Diagnóstico da Neurocisticercose Humana	23
<b>2. OBJETIVOS</b>	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
3.1. Procedência das Amostras de LCR	27
3.2. Obtenção das Formas Larvárias de <i>T. solium</i>	27
3.3. Obtenção das Formas Larvárias de <i>T. crassiceps</i>	28
3.4. Preparo do Extrato Salino Total	28
3.5. Preparo do Extrato SDS	29
3.6. Dosagem de Proteínas e Polissacárides	30
3.7. Preparo do Conjugado Imunoenzimático Anti-IgG Humana	30
3.8. Caracterização do Perfil Eletroforético dos Extratos Antigênicos Obtidos	31
3.8.1. SDS-PAGE em gel de Poliacrilamida	31
3.8.2. Coloração do gel por Nitrato de Prata	33
3.9. Testes Imunológicos	34
3.9.1. Titulação do Conjugado IgG de Coelho anti-IgG Humana-Peroxidase para o Teste ELISA	34

3.9.2	Teste Imunoenzimático ELISA para a Detecção de Anticorpos IgG Anti-Metacestódeos de <i>T. solium</i> Utilizando Metacestódeos de <i>T. solium</i> e de <i>T. crassiceps</i> em Amostras de LCR	35
3.9.3.	Eletroforese em gel de Poliacrilamida e Teste de “Western Blotting” para o Diagnóstico de Neurocisticercose Humana	36
3.9.3.1.	Titulação do Conjugado IgG de Coelho Anti-IgG Humana-Peroxidase pelo Teste ELISA para a Aplicação do Teste “Western Blotting”	36
3.9.3.2.	Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	37
3.9.3.3.	Reação de “Western Blotting”	38
3.10.	Normas de Biossegurança	39
3.11.	Análise Estatística	39
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	41
4.1.	Obtenção e Caracterização dos Extratos Antigênicos Salino e SDS, Homólogos e Heterólogos	41
4.2.	Ensaio Imunoenzimáticos	43
4.2.1.	Padronização do Teste ELISA	43
4.2.2.	Padronização do Teste “Western Blotting”	48
4.3.	Detecção de Anticorpos IgG Anti-Neurocisticercose Humana em Amostras de LCR frente aos Quatro Extratos Antigênicos através dos Testes ELISA e “Western Blotting”	50
4.3.1.	Sensibilidade e Especificidade do Teste ELISA	50
4.3.2.	Análise dos Marcadores Antigênicos Reconhecidos por Amostras de LCR frente aos Extratos Antigênicos através do Teste “Western Blotting”	54
4.4.	Comparações entre os Testes ELISA e “Western Blotting” na Detecção de Anticorpos IgG Anti-Neurocisticercose em Amostras de LCR frente aos Quatro Extratos Antigênicos Utilizados	63
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	68
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	74
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	75

## 1. INTRODUÇÃO

O Complexo Teníase-Cisticercose constitui um grave problema de saúde pública, identificado desde a antiguidade e influenciado por fatores demográficos, técnicos e políticos (SCHANTZ, SARTI, 1989). O metacestódeo (larva ou cisticerco) de *T. solium* foi descrito pela primeira vez por Aristophanes, entre 380 e 375 a.C., como “pedras” localizadas sob a língua de suínos. Posteriormente Aristóteles descreveu as características gerais da cisticercose suína. As “pedras” foram descritas como parasitos de suínos por Redi (1693) e Malpighi (1698). A presença de metacestódeos em humanos foi descrita por Werner (1786). Em 1800 Zeder identificou o gênero *Cysticercus*. Em 1885 Kuchenmister demonstrou que o parasito em suínos era a forma larvária de *T. solium* cujo adulto se desenvolve no homem. Em 1909 Rudolphi classificou a espécie *Cysticercus cellulosae*, esta nomenclatura até hoje é utilizada, porém sem respaldo das regras de taxonomia. A neurocisticercose humana foi descrita pelo médico Cobbold em 1864, que alertou sobre a contaminação através da ingestão de ovos do parasito.

A teníase é uma parasitose intestinal humana provocada pelo estágio adulto de *Taenia solium* (Linnaeus, 1758) ou de *Taenia saginata* (Goeze, 1782); e a cisticercose resulta do parasitismo das larvas dessas tênias nos tecidos de seus respectivos hospedeiros intermediários: suíno e bovino. Estes parasitos pertencem ao Filo Platyhelminthes, Classe Cestoidea, Ordem Cyclophyllidea e Família Taeniidae (REY, 1992).

O ciclo de vida de *T. solium* tem o homem como hospedeiro definitivo e o suíno como hospedeiro intermediário. Os suínos adquirem a cisticercose pela ingestão de ovos do parasito; as larvas metacestódeas se desenvolvem nos músculos esqueléticos e cardíaco, nos olhos e, no sistema nervoso desses animais. O homem ao ingerir carne, mal cozida ou crua, de suínos infectados por metacestódeos de *T. solium* adquire a teníase, que constitui uma helmintíase intestinal. O homem infectado elimina proglotes grávidas nas fezes e estas contêm cerca de 30.000 a 50.000 ovos cada; os suínos possuem hábitos de coprofagia, tendo oportunidade, podem se contaminar pela ingestão das proglotes, completando o ciclo de vida do parasito (WEBBE, 1994). No ciclo de vida de *T. saginata* o homem também é o hospedeiro definitivo e o bovino é o hospedeiro intermediário, acidental, visto que não é coprofágico. Cada proglote grávida eliminada pelo homem, infectado por *T. saginata*, contém de 80.000 a 100.000 ovos do parasito. As formas adultas desta tênia podem medir de quatro a 12 metros de comprimento e de *T. solium*, de um e meio a quatro metros; podem sobreviver de três a sete anos, em média, no hospedeiro humano. A teníase raramente causa sintomatologia importante, e quando o faz é inespecífica. As formas larvárias podem sobreviver em outros mamíferos não os suínos e bovinos, porém as formas adultas dos referidos cestodas somente sobrevivem no hospedeiro humano (DEL BRUTTO, SOTELO, 1988; WEBBE, 1994).

Os ovos de *T. solium* podem infectar o homem, causando cisticercose humana, que resulta num ciclo de vida incompleto; visto que os metacestódeos não conseguem atingir o estágio adulto. Esta infecção está relacionada com a falta de higiene pessoal, a transmissão via fecal-oral, auto-infecção; ou através da contaminação de alimentos e/ou água com ovos do parasito, hetero-infecção (WEBBE, 1994). Há raros relatos de cisticercose humana por outros tenídeos: *Taenia taeniaformis* (Batsch, 1786) e *Taenia*

*crassiceps* (Zeder, 1800; Rodolphi, 1810), cujos estágios adultos são parasitos de gatos e raposas respectivamente. Também é rara a infecção de humanos por tenídeos que parasitam cães como *Taenia multiceps* (Leske, 1780) e *Taenia serialis* (Gervais, 1847) (apud RICHARDS, SCHANTZ, 1991).

### **1.1. Aspectos Morfobiológicos dos Metacestódeos de *Taenia solium***

Os ovos de *T. solium* após serem ingeridos pelo hospedeiro sofrem a ação proteolítica dos sucos gástrico e pancreático, no estômago, liberando os embriões ou oncosferas. Somente poucas oncosferas sobrevivem à ação imune e físico-química local do intestino atravessando a mucosa intestinal, vias linfáticas e capilares regionais, atingem a circulação sangüínea, sendo transportadas ao fígado e pulmões e posteriormente para a circulação sistêmica, alojando-se principalmente no cérebro, olhos, músculos e tecido subcutâneo. Nestes locais sofrem modificações e ao final de 60 a 70 dias transformam-se em metacestódeos (ou cisticercos) que consistem em uma vesícula semitransparente contendo líquido, e um escólex invaginado que possui quatro ventosas, um rostro com 24 a 32 acúleos ou ganchos. As vesículas variam de tamanho, medindo em média 15 mm de comprimento por 8 mm de largura. Excepcionalmente, pode desenvolver-se uma forma especial de metacestódeo, o racemoso, de tamanho consideravelmente maior, apresentando vesículas intercomunicantes, perda de escólex e possuindo cílios em sua superfície externa (WEBBE, 1994).

O número de metacestódeos é variável em cada local anatômico e de um paciente para outro, podendo ir desde dez até 200 ou mais. O cérebro é acometido pelo menos em 60% dos casos, nele estas larvas se localizam em diferentes regiões, principalmente no parênquima, circunvoluções, espaço sub-aracnóideo, meninges, cisternas basais, ventrículos e raramente na medula espinhal (FLISSER *et al.*, 1986).



Os metacestódeos invaginados podem permanecer assim durante muitos anos (até mais de 30), embora o tempo médio de vida seja estimado em cinco a sete anos, quando começam a se degenerar e morrer. Este fato pode coincidir com o início da sintomatologia clínica em cerca de 80% dos pacientes, entretanto, existem pessoas que permanecem assintomáticas por toda a vida, e após necrópsia por outra causa é que se descobre a existência dos metacestódeos (SPINA-FRANÇA, LIVRAMENTO, MACHADO, 1993).

As manifestações clínicas da doença estão na dependência da interação dos seguintes fatores:

- Número de metacestódeos;

- Localização e tamanho dos metacestódeos, quando localizados em áreas silentes, podem passar despercebidos, entretanto, quando se situam em áreas nobres podem incitar o desenvolvimento de quadros neurológicos (CAMARGO-LIMA, 1966);

- Tempo de evolução, é muito variável, geralmente, desconhecido e difícil de se definir a data da infecção. Além disto existe assincronismo entre o processo de degeneração e a morte das larvas, fato este, que pode se evidenciar nos achados tomográficos, onde é usual a visualização simultânea de metacestódeos viáveis, em processo de degeneração e calcificados (SPINA-FRANÇA, KLEINE, 1982).

- Interações parasito-hospedeiro, constituem aspectos fundamentais e que ainda não estão totalmente desvendados, dificultando o entendimento da complexidade e a heterogeneidade da resposta imune do indivíduo contra o parasito (FLISSER *et al.*, 1986).

- As alterações mentais e do comportamento que o paciente de neurocisticercose pode apresentar chamam a atenção, especialmente, pela complexidade e variabilidade de manifestações que podem oscilar desde alterações de memória, distúrbios conductuais até verdadeiras

psicoses. A multiplicidade dos sinais e sintomas cerebrais são explicados em parte por fenômenos mecânicos, obstrutivos e degenerativos dentro do processo inflamatório crônico gerado pela doença (ESTANÖL, CORONA, ABAD, 1986; FORLENZA *et al.*, 1988; TAVARES, 1993).

## **1.2. O Diagnóstico da Cisticercose Humana**

O diagnóstico da cisticercose humana, principalmente da neurocisticercose, é determinado após a análise de dados clínicos, epidemiológicos, diagnóstico por imagem e imunológicos do paciente.

### **1.2.1. Classificação Clínica da Cisticercose Humana**

A cisticercose humana se distingue clinicamente em assintomática e sintomática; e de acordo com a localização do parasito, quatro grupos de pacientes são identificados: no primeiro incluem-se os pacientes com metacestódeos distribuídos nas vísceras, pele e músculos (cisticercose disseminada); o segundo grupo é composto de indivíduos afetados nos olhos e órbita ocular (cisticercose oftalmológica); no terceiro caso os indivíduos apresentam parasitos no SNC (neurocisticercose); e, na quarta situação as pessoas apresentam mistura das classificações anteriores (ZENTENO-ALANIS, 1982).

As manifestações de infecção ativa por estas larvas são mais evidenciadas na forma de neurocisticercose, com sintomatologia variável: hidrocefalia, hipertensão intracraniana aguda, epilepsia e outras disfunções neurológicas e psiquiátricas (WILSON, TSANG, 1995). A cisticercose humana é identificada como a principal causa de epilepsia nos países em desenvolvimento (RICHARDS, SCHANTZ, 1991).

### 1.2.2. Epidemiologia da Cisticercose Humana

O hospedeiro definitivo e obrigatório de *T. solium* é o homem. Não há reservatório silvestre importante (SCHANTZ *et al.*, 1994). Portanto, os mecanismos de transmissão da cisticercose: homem-suíno, homem-homem têm como fator primordial as condições sócio-econômicas e culturais do próprio ser humano. Dentre estas condições destacam-se as sanitárias: higiene pessoal, contaminação da água e de alimentos com ovos do parasito provenientes de indivíduos infectados pela forma adulta de *T. solium*. Outro fator importante para manter a endemia de cisticercose numa dada região geográfica é o sistema primitivo de criação de suínos, pois permite o contato destes animais com fezes humanas mantendo o ciclo de vida de *T. solium*. Este fator, aliado ao hábito de ingestão de carne suína mal-cozida, aumenta a prevalência da teníase estritamente relacionada com a cisticercose humana e suína (DEL-BRUTTO, SOTELO, 1988; WEBBE, 1994; AGAPEJEV, 1996).

A cisticercose é endêmica na América Latina, notavelmente no México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Colômbia, Peru, Bolívia e Brasil; Ásia e África (SCHANTZ, SARTI, 1989). Nos Estados Unidos da América do Norte (USA), a cisticercose humana tem sido diagnosticada com maior frequência nos últimos anos; devido a crescente imigração de indivíduos provenientes de áreas endêmicas de *T. solium* (RICHARDS, SCHANTZ, 1991). No Brasil, a prevalência desta parasitose nas diversas regiões geográficas foi estimada por VIANNA *et al.* (1986), através de um estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em Brasília, Distrito Federal, sendo 8,1 % na região Sudeste, 5,8 % no Nordeste, 5,3 % no Centro-Oeste e 3,5 % no Sul do país.

Em Uberlândia, Minas Gerais, a prevalência de cisticercose humana em necropsia foi analisada por COSTA-CRUZ *et al.*

(1995). Estes autores analisaram no período de 1971 a 1993, 2862 ocorrências de necropsia e encontraram 1,4% de prevalência desta parasitose, em indivíduos com idade acima de um ano.

### **1.2.3. Biópsias, Imagens e Necropsia na Identificação da Cisticercose Humana**

A demonstração direta do parasito para o diagnóstico de cisticercose é possível quando sua localização é subcutânea ou muscular, através de biópsias. No entanto, quando os metacestódeos se situam no SNC são necessários métodos indiretos de diagnóstico, através de radiografias, tomografia axial computadorizada (TC) ou ressonância magnética associados com alterações no líquido cefalorraquidiano (LCR) do paciente (MALAGÓN, 1989). As radiografias simples mostram lesões calcificadas em pacientes com neurocisticercose; porém, não distinguem estes aspectos de outras alterações neurológicas como: carcinoma metastático, tumores ou outros processos infecciosos (tuberculomas, abscessos bacterianos, viroses, infecção fúngica e outros parasitos) (RICHARDS, SCHANTZ, 1991).

Na TC o aspecto do parasito e a natureza da resposta inflamatória influenciam marcadamente na aparência radiológica da cisticercose; a TC identifica tanto metacestódeos vivos (hipodensos) quanto calcificados (hiperdensos) localizados, principalmente, no parênquima cerebral (AGGARWAL, 1993).

A ressonância magnética é a técnica mais recente de diagnóstico por imagem, de alto custo e, de grande valor diagnóstico nos casos em que a TC não é conclusiva: cisticercos localizados intraventricularmente, lesões na base do cérebro, cisticercos viáveis no córtex cerebral, na parede das meninges cerebrais ou nas cisternas cerebrais ou, ainda, na medula espinhal (RICHARDS, SCHANTZ, 1991).

Os laudos de necropsia possibilitam análises retrospectivas da morbidade desta parasitose em determinada área de estudo, num determinado período de tempo. A ocorrência de cisticercose em necropsia realizadas no Brasil de 1916-1991, foi revisada por COSTA *et al.* (1995) que encontraram índices variando de 0,12 a 3,6 %. Verificaram, também, que os dados estatísticos de óbitos humanos por neurocisticercose no Brasil, distribuídos por regiões e estados, no período de 1980 a 1989 demonstraram que a região Sudeste teve o maior número de casos, estando em primeiro lugar o Estado de São Paulo, seguido do Paraná e de Minas Gerais.

#### **1.2.4. Testes Imunológicos Utilizados na Detecção de Anticorpos Anti-metacestódeos de *T. solium***

Os fluidos biológicos que são utilizados para o diagnóstico da cisticercose constam de sangue de punção digital, soro, LCR, humor aquoso ou ainda, a saliva, utilizados de acordo com a sintomatologia, o hospedeiro, ou o tipo de estudo (COSTA-CRUZ, 1995).

A clássica reação de fixação de complemento (RFC), descrita por WEINBERG em 1909 e utilizada no diagnóstico humano por MOSES em 1911, passou até a década de 80 a ter papel central no auxílio diagnóstico, tendo sua positividade sido incorporada à síndrome liquórica da neurocisticercose. As técnicas de RFC utilizam: 50% de hemólise, 100% de hemólise e microtécnica em placas. Em casos de longa evolução da infecção a reação tende a fraca positividade com posterior negatividade; e pode apresentar reações cruzadas com neurosífilis e esquistossomose. Os extratos parasitários apresentam substâncias promotoras ou inibidoras do complemento dificultando a eficiência do teste RFC (LARRALDE, 1989). Diante das limitações na obtenção e preservação dos reagentes biológicos, GARCIA e SOTELO (1991) descreveram um novo teste de fixação de complemento para

o diagnóstico da cisticercose em amostras de LCR, porém não eliminaram as reações inespecíficas.

A intradermorreação e as reações de precipitação em tubos ou gel de ágar, tanto por dupla imunodifusão, quanto por imunoeletroforese ou contraimunoeletroforese, já foram usadas no diagnóstico de cisticercose, mas não obtiveram sucesso, especialmente em função de sua baixa sensibilidade (COSTA-CRUZ, 1995).

A reação de hemaglutinação indireta é simples, rápida e de baixo custo operacional, a sensibilidade deste teste é relativamente baixa pois anticorpos IgG e IgM se ligam às hemácias sensibilizadas, e sabe-se que a eficiência de IgM se ligar pode chegar a 750 vezes mais que da IgG específica (apud PIALARISSI, NITRINI, 1995); além disto, para se comparar os resultados entre diferentes laboratórios, é necessário que se uniformize o método de preparo dos antígenos, devido à grande frequência de resultados falso-positivos (COSTA-CRUZ, 1995). FERREIRA *et al.* (1997) desenvolveram um método em que os reagentes finais da hemaglutinação indireta permanecem estabilizados por um período de seis meses utilizando 50 % de glicerol, armazenamento a 4 °C e hemácias de ganso.

O teste de eritroimunoadsorção por captura para o imunodiagnóstico da neurocisticercose em amostras de LCR, foi padronizado por PIALARISSI, NITRINI (1994), este é um teste simples cujo princípio é a modificação de um teste de hemaglutinação indireta: sensibilizando, previamente, as placas de microtitulação com um imuno-soro classe específico. Este método difere da hemaglutinação passiva pois detecta somente os anticorpos específicos.

A aplicabilidade da reação de imunofluorescência indireta no diagnóstico da cisticercose foi comprovada em vários estudos e, é utilizada na rotina para detecção de anticorpos fixados contra estrutura do

parasito, empregando tanto cortes da larva, por congelação, quanto antígenos particulados (MACHADO, CAMARGO, HOSHINO, 1973). O uso de diferentes anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína possibilita conhecer e quantificar as classes de imunoglobulinas envolvidas, porém o índice de reações cruzadas com outros cestodas é grande em áreas endêmicas (LARRALDE, 1989).

Através do teste de radioimunoensaio, SHORT *et al.* (1990) demonstraram que a subclasse de imunoglobulina IgG4, total e específica, apresenta níveis elevados no LCR de pacientes com neurocisticercose, sugerindo que esta desempenha papel importante na resposta humoral contra a parasitose em questão. Analisaram também os níveis de IgE, total e específico, dos mesmos pacientes e concluíram que não é significativo o aumento da produção desta imunoglobulina.

A introdução de métodos imunoenzimáticos como o teste ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), que não utilizam radioatividade, possibilitam a detecção de anticorpos específicos contra determinada doença, possuem altas sensibilidade e reprodutibilidade e uma boa especificidade; representam os avanços no diagnóstico laboratorial da cisticercose humana (Quadro I) e animal. O teste ELISA foi padronizado, também, para a pesquisa de anticorpos IgM anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de LCR (COSTA *et al.*, 1985). Foram demonstradas as classes de imunoglobulinas, de acordo com os níveis detectados, em ordem decrescente: IgG, IgM, IgA e IgE envolvidas na resposta humoral contra neurocisticercose, sendo que IgG é a mais freqüentemente encontrada, e sua síntese ocorre no SNC (CORREA *et al.*, 1985; ESPINOZA *et al.*, 1986). Níveis de IgE elevados foram detectados por MELO *et al.* (1997) em 27,6 % dos pacientes com neurocisticercose analisados, pelo método ELISA em amostras de LCR.

A utilização de diferentes frações antigênicas desta larva, tais como o extrato salino total, líquido de vesícula, extrato alcalino total, extrato de escóleces ou de membrana, resulta em diferenças de sensibilidade e especificidade do teste (COSTA, 1986) conforme demonstrado no Quadro I; onde observamos também que a sensibilidade e especificidade do teste ELISA, no diagnóstico de neurocisticercose, é maior em amostras de LCR, devido ao grande número de reações cruzadas com outras endemias no soro dos indivíduos, conforme foi demonstrado por LARRALDE *et al.* (1986). O Quadro II apresenta diversas aplicações do teste ELISA no diagnóstico de neurocisticercose humana, onde se observa predominância de testes realizados em países como o Brasil e o México, áreas endêmicas para esta parasitose.

O teste Dot ELISA, utilizando tecido resina ou nitrocelulose, foi padronizado, utilizando o mesmo princípio básico do ELISA com antígenos quimicamente ligados ao tecido e interpretação visual comparando-se com os controles (VAZ, FERREIRA, 1988).

“Western Blotting” é um teste que envolve separação de antígenos por SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrilamide gel electrophoresis) transferindo-os para membranas de nitrocelulose e identificando anticorpos contra determinada doença. Através de reações com as proteínas transferidas para a nitrocelulose, o resultado é visualizado pela coloração das bandas reagentes com as amostras biológicas que contenham anticorpos específicos para cisticercose (BRAND, TSANG, 1989).

Os testes “Western Blotting” padronizados para o diagnóstico desta parasitose, com a identificação de várias bandas específicas, conforme a metodologia adotada, estão sintetizados no Quadro III.

No Quadro IV observa-se as aplicações dos testes “Western Blotting”, onde a metodologia padronizada por TSANG, BRAND,



BOYER (1989), utilizando glicoproteínas de cisticercos de *T. solium*, tem sido empregada por diversos autores.

Os vários testes imunológicos descritos na pesquisa de anticorpos circulantes na cisticercose humana variam de sensibilidade e especificidade devido a fatores inerentes aos próprios métodos ou à utilização de diferentes antígenos totais ou purificados dos metacestódeos de *T. solium*, *Taenia crassiceps* e outros.

A preparação dos antígenos utilizados nos testes de imunodiagnóstico tem um papel muito importante nos resultados obtidos, influenciando tanto na sensibilidade quanto na especificidade do teste (COSTA, 1986). O extrato total corresponde a um conjunto de mais de 20 proteínas quando analisado em SDS-PAGE. O antígeno B é o mais freqüentemente reconhecido pelos soros de pacientes, correspondendo a duas proteínas de pesos moleculares de 105 kDa e 95 kDa (GUERRA, 1982). O extrato total apresenta sensibilidade maior do que o antígeno purificado, porém a especificidade é inferior quando se utiliza, por exemplo, o teste ELISA; em amostras de soros o extrato total pode apresentar alto índice de reações cruzadas dependendo do "cut off" considerado e das endemias locais, sendo que o antígeno B apresenta reação cruzada, basicamente, com hidatidose (PLANCARTE, ESPINOZA, FLISSER, 1989).

A técnica de SDS-PAGE permite melhor discriminação de reações cruzadas, utilizando extrato total do parasita, possibilitando a identificação de várias bandas antigênicas, algumas exclusivas para as larvas ou adultos de *T. solium* e outras compartilhadas com outros cestodas, como por exemplo, *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) (LARRALDE, 1989).

A obtenção de antígenos purificados visa diminuir ou eliminar as reações cruzadas dos testes imunológicos que ocorrem freqüentemente devido a grande variedade antigênica comum entre os

diferentes helmintos, particularmente entre *T. solium* e outros cestodas patogênicos ao homem. Há vários antígenos candidatos à purificação, mas poucos foram completamente testados, embora a especificidade obtida por TSANG, BRAND, BOYER (1989) seja de 100%, utilizando glicoproteínas do parasito, a sensibilidade do teste diminui de 98% para 60-80% em pacientes com uma única lesão no SNC (LARRALDE *et al.*, 1989).

O desempenho de um teste sorológico é influenciado por vários fatores, dentre eles, a localização do parasito, a intensidade do parasitismo, o tempo de infecção, a frequência de contatos com o agente, a resposta imune do hospedeiro, tratamento concomitante e, variação antigênica do parasito (LARRALDE *et al.*, 1989; VENKATESAN, WAKELIN, 1993).

Os testes imunológicos têm sido muito úteis no auxílio diagnóstico da cisticercose humana e suína. Constituem métodos auxiliares porque somente a presença de anticorpos nas amostras biológicas, detectáveis, contra os antígenos empregados não traduzem uma infecção ativa e nem mesmo uma infecção atual (LARRALDE, 1989).

A combinação dos testes ELISA e "Western Blotting" evidencia uma proeminente tecnologia de imunodiagnóstico da cisticercose humana, visto que podem reduzir os resultados falso-positivos do primeiro e os custos do segundo. }

Quadro I - Testes ELISA Padronizados para o Diagnóstico da Neurocisticercose Humana.

Extrato Antigênico	Amostra (n)	Espécime	Imunoglobulina pesquisada	Sensibilidade (%) LCR	Soro	Especificidade (%) LCR	Soro	Autor (es) e Ano de Publicação
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	124	Soro	gamaglobulina		77,55		94,66	ARAMBULO
Total, adulto <i>T. solium</i>					77,55		100,00	<i>et al.</i> , 1978
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	25	LCR	IgG	80,00	79,00	NDR	82,90	DIWAN <i>et al.</i> , 1982
	184	Soro			(México) 61,00 (Irian Jaya)			
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	80	LCR	IgG	100,00		97,30		COSTA <i>et al.</i> , 1982
Parcialmente purificado "chromatofocused", cisticercos <i>T. solium</i>	351	Soro	IgG		80,00	95,00-97,00 (Papua New Guinea) 100,00 (USA)		COKER-VANN, BROWN, GAJDUSEK, 1984
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	45	LCR	IgG	55,60	45,50	NDR	91,14	PAMMENTER, ROSSOUW, 1984
	44	Soro						
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	38	LCR	IgG	94,70	98,50	94,70	100,00	MOHAMMAD <i>et al.</i> , 1984
	50	Soro						
Glicoprotéico larvário <i>T. solium</i>	41	LCR	IgM	46,20		100,00		COSTA <i>et al.</i> , 1985
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	34	LCR	IgG	31,00	92,00	NDR	NDR	GONZALEZ, RAMIREZ, RODRIGUEZ 1985
	135	Soro						
Alcalino total, cisticercos <i>T. solium</i>	115	LCR	IgG	77,10	62,80	100,00	100,00	COSTA, 1986
Escólex, cisticercos <i>T. solium</i>	182	Soro		89,60	88,60	100,00	100,00	
Membrana, cisticercos <i>T. solium</i>				91,70	88,60	98,50	100,00	
Salino total, cisticercos <i>T. solium</i>				100,00	85,70	98,50	100,00	
Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. solium</i>				100,00	88,60	98,50	100,00	
AgB parcialmente purificado, cisticercos <i>T. solium</i>	168	LCR	IgG	90,00	80,00	98,00	96,00	ESPINOZA <i>et al.</i> , 1986
	162	Soro		90,00	85,00	100,00	100,00	
Total, cisticercos <i>T. solium</i>								
Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. solium</i>	54	Soro	IgG		100,00	95,00 (endêmica) 80,00 ( não endêmica)		LARRALDE <i>et al.</i> , 1986
Total, cisticercos <i>T. solium</i> (Dot-ELISA)	181	LCR	IgG	98,60	94,70	100,00	92,00	VAZ, FERREIRA, 1988
	88	Soro						
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	235	Soro	IgG		85,00		87,00	MICHAULT <i>et al.</i> , 1988

Líquido de vesícula, - cisticercos <i>T. solium</i> ; Líquido de vesícula, - cisticercos <i>T. solium</i> ; Protoescólex, cisticercos <i>T. solium</i> ; Membrana, cisticercos <i>T. solium</i> .	70	Soro	IgG	
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	194	Soro	IgG	
Membrana, cisticercos: <i>T. solium</i> e <i>T. crassiceps</i>	192	LCR	IgG	95,00 97,00
Líquido de vesícula, cisticercos: <i>T. solium</i> e <i>T. crassiceps</i>				95,00 92,00
Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. solium</i>	100 150	LCR Soro	IgG	100,00
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	83 54	Saliva Soro	IgG	Saliva 82,10
Purificado por imunoafinidade, cisticercos <i>T. solium</i> (64-68 kDa) Total, cisticercos <i>T. solium</i> Membrana, cisticercos <i>T. solium</i> Escólex, cisticercos <i>T. solium</i> Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. solium</i> Total, cisticercos <i>T. solium</i>	299	LCR	IgG	83,30 100,00 91,60 100,00 100,00
	135 152	LCR Soro	IgG	88,00
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	21 193	LCR Soro	gamaglobulina	62,00
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	87 208	LCR Soro	IgG	85,10
Membrana e escólex, cisticercos <i>T. solium</i> Membrana e escólex, cisticercos <i>T. crassiceps</i> Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. solium</i> Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. crassiceps</i> (Dot-ELISA)	73	LCR	IgG	95,10 95,10 97,60 97,60

NDR: não demonstrado ou não realizado.

72,22	NDR	BAILY <i>et al.</i> , 1988
66,66	NDR	
50,00	NDR	
33,33	NDR	
96,50	85,70	MICHAULT <i>et al.</i> , 1990
96,00		LARRALDE <i>et al.</i> , 1990
96,00		
98,00		
98,00		
100,00	NDR	98,00 ZINI, FARRELL, WADEE, 1990
74,10	Saliva 100,00	98,00 FELDMAN <i>et al.</i> , 1990
	97,21	KATTI, CHANDRAMUKHI, 1991
	95,50	
	97,21	
	96,10	
	94,40	
92,00	94,00	86,73 MALLA <i>et al.</i> , 1992
65,00	NDR	63,00 DIAZ <i>et al.</i> , 1992
	(Bangladesh)	
	91,00	
	(USA)	
85,10	100,00	91,40 RETAMAL <i>et al.</i> , 1995
	90,60	VAZ <i>et al.</i> , 1996
	90,60	
	96,90	
	100,00	

Quadro II - Aplicação do Teste ELISA no diagnóstico de Neurocisticercose Humana.

Extrato Antigênico	Amostra (n)	Espécime	Imunoglobulina	Sensibilidade ou a Positividade (%)		Procedência Geográfica da amostra	Autor(es) e Ano de Publicação
				LCR	Soro		
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	120	LCR	IgG	71,00	79,00	México	TÉLLEZ GIRÓN <i>et al.</i> , 1984
	120	Soro					
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	13	LCR	IgG	31,00	92,00	Colômbia	GONZALEZ, RAMIREZ, RODRIGUEZ, 1985
	136	Soro					
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	120	LCR	IgG	16,70	5,20	Brasil	VIANNA <i>et al.</i> , 1986
	1122	Soro					
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	29	LCR	IgG	55,00		Europa, América Latina, África do Sul	GOTTSTEIN, ZINI, SCHANTZ, 1987
	306	Soro		75,00			
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	153	Soro	IgG		65,64	Brasil	NASCIMENTO, NOGUEIRA, TAVARES, 1987
Escólex, cisticercos <i>T. solium</i>					90,90		
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	117	Soro	IgG		6,00	México	SARTI-GUTIERREZ <i>et al.</i> , 1988
Total, cisticercos <i>T. solium</i> (Dot-ELISA)	277	LCR	IgG	11,60		Brasil	VAZ <i>et al.</i> , 1990
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	221	Soro	IgG		36,00	Papua New Guinea	FRITZSCHE <i>et al.</i> , 1990
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	335	LCR	IgG	97,70		Brasil	BASSI <i>et al.</i> , 1991
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	50	Soro	IgG		80,00	China	ZHI-BIAO, DAN, 1992
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	120	LCR	IgG	16,70	5,20	Brasil	VIANNA <i>et al.</i> , 1992
	1122	Soro					
Glicoprotéico, cisticercos <i>T. solium</i>	28	LCR	IgM	32,14			
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	26	LCR	IgG	23,00		Brasil	SILVA-VERGARA <i>et al.</i> , 1994
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	2524	Soro	IgG		25,00	México	SCHANTZ <i>et al.</i> , 1994b

Glicoproteína purificada, cisticercos <i>T. solium</i> (GP 24)	16 60	LCR Soro	IgG
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	1052	LCR Soro	IgG
Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. solium</i> Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. crassiceps</i>	200	LCR	IgG
Total cisticercos <i>T. solium</i>	143	LCR	IgG
Total cisticercos <i>T. solium</i>	41 70	LCR Soro	IgG

NDR: não demonstrado ou não realizado.

	100,00 100,00	México	PLANCARTE, FEXAS, FLISSER, 1994
14,00	4,00	México	MONDRAGÓN, PLANCARTE, FLISSER, 1994
100,00		México	GARCIA, ORDONEZ, SOTELO, 1995
97,00 98,20		Brasil	PIALARISSI, NITRINI, 1995
39,00	NDR	La Réunion (oceano indico)	SIMAC <i>et al.</i> , 1995



Quadro III - Testes "Western Blotting" padronizados para o diagnóstico de Neurocisticercose Humana.

Extrato Antigênico	Amostra (n)	Espécim e	Imunoglobuli na pesquisada	Sensibilidade (%) LCR	Soro	Especificidade (%) LCR	Soro	Bandas Específicas kDa	Autor(es) e Ano de Publicação
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	7 35	LCR Soro	IgG	75,00 100,00	87,50 100,00	100,00 100,00	100,00 100,00	8 26	GOTTSTEIN, TSANG, SCHANTZ, 1986
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	46 532	LCR Soro	IgG	98,00	98,00	100,00	100,00	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13.	TSANG, BRAND, BOYER, 1989.
Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. solium</i>	78	Soro	IgG		99,50		100,00	108, 23	LARRALDE <i>et al.</i> ,
Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. crassiceps</i>					99,50		100,00	88	1989.
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	83 54	Saliva Soro	IgG	Saliva 70,40	100,00	Saliva 100,00	100,00	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	FELDMAN <i>et al.</i> , 1990
Total, cisticercos <i>T. solium</i> :	299	LCR	IgG	100,00		90-100,00		64-68, 45, 24-28	KATTI, CHADRAMUKHI 1991
Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. solium</i>				100,00		90-100,00			
Membrana, cisticercos <i>T. solium</i>				100,00		90-100,00			
Escólex, cisticercos <i>T. solium</i>				100,00		90-100,00			
Total, cisticercos <i>T. solium</i>				100,00		90-100,00			
AgB, cisticercos <i>T. solium</i>				100,00		90-100,00			
Purificado, cisticercos <i>T. solium</i> , por imunoafini- dade(64-68kDa)				> 90,00 100,00		100,00 90-100,00			
Líquido de vesícula cisticercos <i>T. crassiceps</i> .	200	LCR	IgG	93,00		98,00		45 a 110	GARCIA, ORDONEZ, SOTELO, 1995
Líquido de vesícula cisticercos <i>T. solium</i> .				100,00		100,00			
Membrana, cisticercos <i>T. solium</i>	55	LCR	IgG	95,60		100,00		155, 120,	VAZ <i>et al.</i> , 1997
Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. solium</i>				91,30		100,00		115-108, 98-92,	
Membrana, cisticercos <i>T. crassiceps</i>				91,30		100,00		98-94, 95-92, 76,	
Líquido de vesícula, cisticercos <i>T. crassiceps</i>				91,30		100,00		72-68, 72, 62, 56-52, e 42.	

NDR: não demonstrado ou não realizado.

Quadro IV - Aplicação dos Testes "Western Blotting" no diagnóstico de Neurocisticercose Humana.

Extrato Antigênico	Amostra (n)	Espécime	Imunoglobulina Pesquisada	Sensibilidade ou Positividade (%)	Soro	Bandas Específicas kDa	Procedência Geográfica da amostra	Autor(es) e Ano de Publicação
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	7 26	LCR Soro	IgG	100,00	92,00	8 26	Europa, América Latina, África do Sul	GOTTSTEIN, ZINI, SCHANTZ, 1987
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	79	Soro	IgG		21,20	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	Equador	FRITZCHE <i>et al.</i> , 1990
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	145 575	LCR Soro	IgG	98,00	98,00	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	Panamá	GRACIA <i>et al.</i> , 1990
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	1552	Soro	IgG		10,80	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	México	SARTI <i>et al.</i> , 1992
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	21 85	LCR Soro	IgG	86,00	94,00	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	Peru	DIAZ <i>et al.</i> , 1992
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	383	Soro	IgG		8,00	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	Peru	GARCIA <i>et al.</i> , 1994
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	50	Soro	IgG		70,00	26	China	ZHI-BIAO, DAN, 1992
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	675	Soro	IgG		5,33	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	Peru	MORO <i>et al.</i> , 1994
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	2524	Soro	IgG		8,00	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	México	SCHANTZ <i>et al.</i> , 1994b
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	1005	Soro	IgG		4,90	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	México	SARTI <i>et al.</i> , 1994
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	52	Soro	IgG		21,20	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	Equador	CRUZ <i>et al.</i> , 1995
Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	362 932	LCR Soro	IgG	28,00	18,80	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	Peru	GARCIA <i>et al.</i> , 1995

Glicoproteínas purificadas, cisticercos <i>T. solium</i>	49	Soro	IgG	-	100,00	50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13	Peru	GARCIA <i>et al.</i> , 1997
Total, cisticercos <i>T. solium</i>	95 104	LCR Soro	IgG	24,20 31,70		13,14,18,21,24	África	ADRIANTSIMAHAVANDY <i>et al.</i> , 1997

NDR: não demonstrado ou não realizado.

#### 1.2.4.a. Metacestódeos de *Taenia crassiceps* como Fonte Heteróloga de Antígenos para o Diagnóstico da Cisticercose

A demanda de metacestódeos de *T. solium* para preparações antigênicas e afins, tem crescido muito nos últimos anos, porém a obtenção deste material biológico é dificultada devido ao alto índice de abate clandestino de suínos naturalmente infectados e posterior comercialização ilegal dos produtos obtidos (LARRALDE *et al.*, 1990; BIONDI *et al.*, 1996). Alguns pesquisadores têm testado a utilização de antígenos heterólogos. Dentre estes destaca-se a utilização de metacestódeos de *T. crassiceps* que é um parasita cuja forma adulta é usualmente encontrada no intestino de raposas (“red foxes”) da Europa e América do Norte. O estágio larvário ou cisticerco (também conhecido como *Cysticercus longicollis*) desenvolve-se no intestino delgado de roedores, que adquirem a infecção pela ingestão de ovos eliminados nas fezes de canídeos infectados pela forma adulta. A cepa ORF do parasito tem sido vastamente usada devido a sua habilidade em multiplicar-se, rapidamente, na cavidade peritoneal de camundongos (FREEMAN, 1962). A reatividade cruzada entre antígenos de cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* (LARRALDE *et al.*, 1989) possibilitou o uso de antígenos heterólogos no diagnóstico da cisticercose humana (LARRALDE *et al.*, 1990) e da cisticercose suína (BIONDI *et al.*, 1996). Esta espécie têm sido utilizada, também como modelo de estudo da cisticercose experimental (FERNANDEZ-GOMEZ *et al.*, 1986)

A cultura “in vitro” de células larvárias de *T. crassiceps*, linhagem ORF, e a regeneração dos cisticercos após a inoculação destas células na cavidade peritoneal de camundongos BALB/cAnN que são susceptíveis a infecção, foram demonstradas por TOLEDO *et al.* (1997). Os parasitos são capazes de se multiplicarem normalmente, após regenerados.

Os metacestódeos de *T. crassiceps* raramente infectam humanos, porém indivíduos com a síndrome da imunodeficiência humana adquirida podem se infectar (KLINKER *et al.*, 1992).

Utilizando a técnica de "Western Blotting" para comparação de bandas antigênicas entre *T. solium*, *E. granulosus* e *T. crassiceps*, bem como reações cruzadas no diagnóstico de cisticercose e hidatidose; em amostras de soros de enfermos e de pessoas saudáveis, LARRALDE *et al.* (1989), obtiveram várias bandas antigênicas comuns no fluido de vesícula das três espécies analisadas. Para o diagnóstico específico da cisticercose evidenciou-se que *T. solium* contém oito antígenos, principalmente a banda de 108 kDa e *T. crassiceps* possui quatro antígenos diferentes, principalmente a banda 88 kDa, demonstrado no Quadro III.

Em amostras de LCR, LARRALDE *et al.* (1990), obtiveram 92-97 % de sensibilidade e 96-98 % de especificidade, empregado antígenos de metacestódeos de *T. crassiceps* em dois laboratórios distintos, para o diagnóstico da neurocisticercose pelo teste ELISA (Quadro I).

No Brasil, foi realizado um estudo comparativo de caracterização antigênica e imunológica entre as larvas de *T. solium* e *T. crassiceps*, utilizando SDS-PAGE (gradiente do gel: 7,5 a 15 %) e "immunoblots" identificaram várias bandas antigênicas, nos extratos de membrana e líquido de vesícula, comuns a essas larvas: 6 bandas de 250 a 58 kDa, 8 (210 a 34 kDa), 11 (245 a 38-36 kDa), e 6 (250-92 a 38,5-37 kDa) (VAZ, FERREIRA, 1994). O teste de hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos anti- neurocisticercose humana, em amostras de LCR, utilizando líquido de vesícula de metacestódeos de *T. crassiceps*, foi padronizado por FERREIRA *et al.* (1997) que obtiveram 82,9 % de sensibilidade.

#### **1.2.4.b. A Utilização do SDS para Extração de Antígenos**

A preparação de antígenos utilizando o SDS pode liberar epítomos identificáveis pelos anticorpos presentes nas amostras de LCR, visto que o SDS tem a propriedade de dissolver os proteolípideos e promover a rápida solubilização de todos os tipos de proteínas (LEES, PAXMAN, 1972; PETERSON, 1979).

#### **1.2.4.c. Tecnologia Molecular no Diagnóstico da Cisticercose Humana**

Os avanços tecnológicos, a nível molecular, têm sido utilizados com o objetivo de aumentar a especificidade dos ensaios aplicados ao diagnóstico da cisticercose, humana e suína, bem como para a criação de vacinas eficazes na prevenção desta parasitose (McMANUS, 1990).

A tecnologia do DNA recombinante pode ser uma resposta para se obter antígenos específicos de metacestódeos de *T. solium*, capazes de eliminar os resultados falso-positivos dos testes ELISA padronizados para o imunodiagnóstico desta parasitose. Este fato ocorre, principalmente, em áreas endêmicas para *E. granulosus*. A aplicação da reação em cadeia de polimerase (PCR) propicia a detecção de pequenas quantidades de tecidos do parasita em amostras dos hospedeiros, com o uso de “primer” (uma seqüência de DNA do parasita) espécie-específico pode se diagnosticar a presença de antígenos nas fezes (McMANUS, 1990).

#### **1.2.5. Interpretação do Diagnóstico da Neurocisticercose Humana**

O diagnóstico da neurocisticercose humana não é facilmente concluído, visto que esta parasitose não apresenta sintomatologia específica e, além disto, existem pacientes que permanecem assintomáticos por muitos anos ou por toda a vida (DEL BRUTTO, SOTELO, 1988; WEBBE, 1994).

As modernas técnicas de imunodiagnóstico e neuroimagem permitem a identificação crescente de casos da doença, porém não são viáveis em muitas áreas do mundo onde esta parasitose é endêmica, devido aos altos custos dos equipamentos e operação. E, frequentemente, não são conclusivos isoladamente.

Visando o diagnóstico mais fidedigno foi elaborada uma proposta de critério diagnóstico para cisticercose e neurocisticercose em que os dados clínicos, radiológicos, imunológicos e epidemiológicos do paciente são ordenados em critérios: absoluto, principal, secundário e epidemiológico. A interpretação destes critérios permitem estabelecer o diagnóstico do paciente para cisticercose e/ou neurocisticercose de acordo com uma das três classes de diagnóstico: definitivo, provável ou possível (DEL BRUTTO *et al.*, 1996). O diagnóstico da neurocisticercose humana, por esta proposta, é determinado pela presença dos seguintes critérios: 1) Absoluto - demonstração histológica do parasito por biópsia de lesão cerebral ou evidência de lesões císticas cerebrais mostrando o escólex do parasito por TC ou ressonância magnética; 2) Principal - evidência de lesões sugestivas de cisticercose por neuroimagem e teste ELISA positivo em amostras de LCR; 3) Secundário - evidência de calcificações intracranianas por raio X, presença de manifestações clínicas sugestivas de neurocisticercose e desaparecimento das lesões císticas intracranianas após tratamento com drogas anti-metacestódeos. O critério epidemiológico inclui as seguintes condições: indivíduos provenientes ou que vivem em área onde a cisticercose é endêmica; história de viagem frequente para áreas endêmicas de cisticercose e evidências de contato com hospedeiro de infecção por *T. solium*. Para se determinar a classe diagnóstica de neurocisticercose de um determinado paciente segue-se o seguinte esquema: diagnóstico definitivo - presença de um critério absoluto ou de dois critérios principais ou de um principais, dois secundários e um

epidemiológico; diagnóstico provável - presença de um critério principal e de dois secundários ou de um principal, um secundário e um epidemiológico ou ainda, a presença de três critérios secundários e um epidemiológico; para o diagnóstico possível - a presença de um critério principal ou de dois secundários ou de um secundário e um epidemiológico (DEL BRUTTO *et al.*,1996).



## 2. OBJETIVOS

A dificuldade de obtenção de metacestódeos de *Taenia solium* para a preparação de extratos antigênicos utilizados na realização de testes imunológicos no diagnóstico da cisticercose humana continua sendo o fator limitante na padronização de novas tecnologias.

A busca de extratos antigênicos homólogos e heterólogos alternativos se faz necessário para a aplicação de testes imunológicos de altas sensibilidade e especificidade no diagnóstico da cisticercose humana. Para tanto propõe-se:

- 2.1. Produzir extrato salino total e extrato SDS das formas larvárias de *T. solium* e *T. crassiceps*;
- 2.2. Utilizar o teste ELISA com extrato salino total das larvas de *T. solium* e padronizar sua utilização frente ao extrato SDS de metacestódeos de *T. solium* e frente aos dois extratos antigênicos heterólogos;
- 2.3. Padronizar o teste “Western Blotting” frente aos quatro extratos obtidos;
- 2.4. Testar amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose e outras alterações neurológicas;
- 2.5. Proceder à análise comparativa dos testes frente aos extratos obtidos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Procedência das Amostras de LCR

As 84 amostras de LCR foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia - MG (HC-UFU) nas unidades ambulatoriais, enfermarias ou no serviço de pronto socorro de Neurologia. Tais amostras foram enviadas ao Laboratório de Parasitologia da UFU para serem submetidas a teste de imunodiagnóstico (ELISA IgG indireto) (COSTA *et al.*, 1992) para neurocisticercose. Estas amostras, portanto se encontravam identificadas e estocadas a - 20 °C. Do total de amostras acima citado: 40 foram provenientes de pessoas com diagnóstico comprovado de neurocisticercose através de síndrome clínica (cefaléia, meningite, epilepsia, mielopatias, hemiparesias, distúrbios de comportamento e vertigem), dados epidemiológicos, tomografia axial computadorizada, ressonância magnética e/ou cirurgia neurológica, teste ELISA IgG positivo. Foram testadas 39 amostras de pacientes (13 epilepsia, 7 meningite, 8 cefaléia, 1 acidente vascular cerebral, 4 hidrocefalia e 6 distúrbios de comportamento) cujo diagnóstico de neurocisticercose foi excluído. Estes constituíram o grupo controle negativo. O restante das amostras de LCR foram provenientes de cinco pacientes com suspeita clínica de neurocisticercose

#### 3.2. Obtenção das Formas Larvárias de *T. solium*

Foram utilizados metacestódeos de *T. solium*, íntegros e rompidos, providos de músculos esqueléticos de suíno naturalmente infectado, lavados em solução salina (NaCl 0,15 M) por quatro vezes, identificados e armazenados a - 20 ° C no Laboratório de Parasitologia da UFU. Este material biológico foi cedido pela Profa. Dagmar Diniz Cabral, do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia desta Universidade.

### 3.3. Obtenção das Formas Larvárias de *T. crassiceps*

Os metacestódeos, cepa ORF de *T. crassiceps*, foram fornecidos pelo Prof. Dr. Germano Francisco Biondi, da UNESP, Botucatu SP, os quais foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos AJ Sneel. Estes animais foram utilizados para a manutenção da cepa referida, em laboratório, através da inoculação de larvas do Cestoda intra-peritonealmente, com alto rendimento, em número e qualidade, após 90 dias da inoculação. Após este período realizou-se o sacrifício dos camundongos seguido da dissecação abdominal para retirada das larvas cultivadas com seringa adaptada. A seleção das larvas para a produção de extratos antigênicos foi feita pela escolha das menores e que não estavam degeneradas e nem calcificadas. As larvas obtidas resultaram em formas íntegras e rompidas, que após quatro lavagens em solução salina (NaCl 0,15 M) foram identificadas e, conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4. Preparo do Extrato Salino Total

Foram utilizados 50 metacestódeos de *T. solium* e 200 metacestódeos de *T. crassiceps*, íntegros e rompidos, para o preparo de extrato salino total. O processo, segundo COSTA *et al.* (1982), é realizado ressuspendendo-se os cisticercos obtidos após o rompimento dos mesmos em 5 ml de água destilada. A seguir esta preparação foi submetida a homogeneizador de tecidos (Glas-Col) a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e posterior tratamento de ultra-som (Thornton, Inpec Eletrônica São Paulo, Brasil) a 40 khz por quatro períodos de 30 segundos em banho de gelo. Após isotonização com 5 ml de solução de NaCl 0,3 M, empregou-se mais três períodos de ultra-som. Em seguida, a mistura foi submetida a  $4^{\circ}\text{C}$  por duas horas sob agitação lenta e, após, centrifugada a 10.000 g (Du Pont SORVALL Products

Newtown, Connecticut, USA) por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante obtido constituiu o extrato salino total.

Os extratos salinos obtidos, homólogo e heterólogo, foram divididos em volumes de 250 µl, identificados e conservados a -20°C até o momento do uso.

### 3.5. Preparo do Extrato Sulfato Duodecil de Sódio (SDS)

Utilizou-se 50 metacestódeos de *T. solium* e 200 de *T. crassiceps* lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS), preparada com  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHPO}_4$  e  $\text{NaCl}$  (0,01 M e pH 7,2). Um total de 10 ml desta suspensão foi submetido a 2000 g, 4°C em centrífuga refrigerada (Du Pont SORVALL Products Newtown, Connecticut, USA) durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 10 ml de PBS e submetido a nova centrifugação, procedimento idêntico ao anterior. Esta lavagem foi repetida mais duas vezes e o sedimento homogeneizado com 2,5 ml de tampão de extração (Tris-HCl - hidroximetil-aminometano - 0,5 M pH 6,8, 20% de glicerol, 4% SDS e água destilada) (Sigma, T 8524, G 8898, L 4509). Esta preparação foi submetida a homogeneizador de tecidos (Glas-Col) durante 20 minutos, em banho de gelo, para se obter uma fragmentação dos cisticercos. Posteriormente acrescentou-se 2,5 ml de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8; 20% glicerol, 4% SDS, 2% azul de bromofenol - Merck, Germany ). Os extratos antigênicos obtidos foram divididos em alíquotas de 250 µl em tubos tipo "Eppendorf", identificados e estocados a -20°C. Uma alíquota de 1 ml de cada extrato SDS, homólogo e heterólogo, foi submetida a membrana de diálise (Sigma, D 9777) contra PBS, visando a eliminação das substâncias: Tris-HCl, SDS, glicerol e azul de bromofenol, pois segundo PETERSON (1979) interferem no ensaio imunoenzimático e na dosagem proteica

### 3.6. Dosagem de Proteínas e Polissacárides

As dosagens protéicas dos extratos salinos totais e extratos SDS, homólogo e heterólogo, foram realizadas pelo método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma, A 7906). O teor de polissacárides dos extratos, salino total e SDS, foram dosados pelo método de MARTIRANI *et al.* (1959), utilizando-se a dextrose (D-glucose anidra PA Labsynth, São Paulo, Brasil) como padrão.

### 3.7. Preparo do Conjugado Imunoenzimático Anti-IgG Humana

A preparação do conjugado imunoenzimático foi realizada de acordo com a técnica descrita por WILSON, NAKANE (1978). Pesou-se 5 mg de peroxidase (horseradish peroxidase, type VII, Sigma, P 0889); que foi dissolvida em 1,25 ml de água bidestilada, adicionou-se a esta solução, gota a gota, 0,25 ml de NaIO<sub>4</sub> (periodato de sódio) 0,1 M (Sigma, S 1878) sob agitação lenta à temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período procedeu-se à diálise da solução contra tampão acetato 1 mM, pH 4,4, a 4 ° C “overnight”.

No dia seguinte, diluiu-se 10 mg do anticorpo IgG de coelho anti-IgG humana, (obtido após esquema de imunização de coelhos com IgG humana purificada pelo Laboratório de Imunologia da UFU), em 1 ml de PBS; retirou-se a peroxidase da diálise e adicionou-a, gota a gota, à solução contento o anticorpo, sob agitação lenta e à temperatura ambiente. Adicionou-se cerca de 50 µl de tampão carbonato 0,5 M, pH 9,5 esta preparação foi deixada em agitação lenta por 2 horas, adicionou-se em seguida 65 µl de NaBH<sub>4</sub> (boridreto de sódio) 0,1 M (Sigma, S9125) e deixou-se sob agitação lenta por 2 horas. Procedeu-se a concentração osmótica da solução em sacarose por cerca de 4 vezes, 4° C durante 3 horas. A solução concentrada foi

submetida à diálise contra PBS a 4° C, “overnight”. Na manhã seguinte a solução foi submetida à cromatografia em coluna (1.5 x 70 cm) de Sephadex G-75 (Merck, Germany) coletando 50 gotas por tubo de hemólise à um fluxo de aproximadamente 8 gotas/ min. Procedeu-se à medida de densidade óptica do material coletado, nos tubos de hemólise, a 280 e 403 nm em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brasil). Realizou-se, em seguida um “pool” dos tubos contendo o conjugado e mediu-se a densidade óptica a 280 e 403 nm; calculou-se a relação E/P (molar). Concentrou-se esta solução, conforme descrito anteriormente, cerca de 10 vezes. Em seguida submeteu-se a solução à diálise contra PBS “overnight” a 4 °C. Adicionou-se, então, glicerina (Merck, Germany) (v/v) na solução obtida, dividiu-se em alíquotas de 200 µl, identificou-se e estocou-se o conjugado a - 20 °C.

### **3.8. Caracterização do Perfil Eletroforético dos Extratos Antigênicos Obtidos**

#### **3.8.1. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida**

Para caracterizar o perfil eletroforético dos quatro extratos antigênicos obtidos foi empregada a técnica de eletroforese vertical, em sistema de tampões descontínuos, em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, segundo LAEMMLI (1970).

Para a preparação do gel, placas de vidro medindo 15 x 17 cm foram lavadas com detergente neutro e enxaguadas várias vezes com água destilada. Após secagem, as placas de vidro foram submetidas a uma limpeza complementar com álcool-éter (v/v) e novamente com água destilada. Após esse processo, as placas foram colocadas para secar em estufa a 37° C por 20 minutos. Depois de secas, foram montadas empregando-se espaçadores de teflon de 1mm de espessura. Aplicou-se solução de ágar a 4 % em ambas as

faces dos espaçadores dispostos lateral e inferiormente nos moldes de vidro, e as placas foram mantidas por garras metálicas, visando vedá-las após a solidificação do ágar.

Para a preparação do gel de separação, utilizou-se: Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; SDS 0,1 %; ácido etileno-diamino-tetra-ácetico 2 mM (EDTA); acrilamida a 30 %; bis-acrilamida (N,N'-Metileno-bis-acrilamida) a 0,8%; N,N,N,N-tetrametil-aminometano a 0,125 % (TEMED) e persulfato de amônio a 0,125 % (APS). A procedência dos reagentes utilizados foi: Quimibrás Indústrias Químicas S.A. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: EDTA; Pharmacia-LKB, Produtos AB, Bromma, Suécia: acrilamida e bis-acrilamida, TEMED e persulfato de amônio.

A mistura correspondente ao gel de 12 % de acrilamida/bis-acrilamida foi colocada lentamente para dentro das placas montadas, tomando-se cuidado para evitar a formação de bolhas no interior do gel. Para evitar a polimerização do gel em presença de oxigênio, colocou-se uma camada de butanol (Merck, Germany), que foi descartada, inclinando-se as placas de vidro montadas, após aproximadamente 20 minutos, quando a polimerização do gel de separação foi completada.

Em seguida, procedeu-se à preparação do gel de empilhamento. Este consistia de: Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1 %; EDTA 2 mM; acrilamida-bis-acrilamida 5 %; TEMED 0,125 % e APS a 0,125 %. Após o gel de empilhamento ser depositado na placa, aplicou-se o pente (molde de teflon) para a formação dos poços de aplicação, aguardando-se 20 minutos para que ocorresse a polimerização.

Nas placas contendo o gel a 12 % foram aplicados 5 µl de cada extrato antigênico obtidos diluídos (v/v) em tampão de amostra, com a concentração de 4 µg /coluna de proteínas, após fervura em banho-maria a 100° C durante três minutos. Aplicou-se também padrões de alto e baixo peso

molecular, no volume de 3  $\mu$ l para cada padrão, do “kit” contendo marcadores de pesos moleculares (“Electrophoresis calibration for molecular weight determination of high and low molecular weight proteins”, Sigma, M3913 e M3788) como se segue: Miosina (205 kDa);  $\beta$ -Galactosidase (116 kDa); Fosforilase b (97 kDa); Frutose-6-fosfato quinase (84 kDa); Soroalbumina bovina (66 kDa); Desidrogenase glutâmica (55 kDa); Ovobumina (45 kDa); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa); Anidrase carbônica (29 kDa); Tripsinogênio (24 kDa); Inibidor de tripsina (20 kDa);  $\alpha$ -Lactalbumina (14 kDa); Aprotinina (6 kDa).

A corrida eletroforética foi realizada em corrente de 20 mA e voltagem de 250 V por aproximadamente quatro horas, quando então o corante indicador (azul de bromofenol) atingiu o final do gel.

### 3.8.2. Coloração do gel por Nitrato de Prata

O gel preparado, conforme descrito no item anterior, foi cuidadosamente removido e mergulhado em solução fixadora por 14 horas à temperatura ambiente. Essa solução foi composta de: 50 % metanol (Merck, Germany), 12 % ácido acético (Indústria Farmacêutica Rio Química - São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e 0,05 % formaldeído (Quimibrás Indústrias Químicas S.A Rio de Janeiro).

A solução fixadora foi, em seguida despezada e o gel foi corado por nitrato de prata segundo o método descrito por FRIEDMAN (1982), no qual os polipeptídeos se destacam pela cor amarelada. Foram realizados três banhos consecutivos de 20 minutos cada com etanol a 50 %, anteriormente ao pré-tratamento com 0,1 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (tiosulfato de sódio), em 500 ml de água destilada, durante um minuto. Lavou-se com água bi-destilada três vezes durante 20 minutos cada e procedeu-se à impregnação com 2g/l de  $\text{AgNO}_3$  (nitrato de prata) por 20 minutos, adicionando-se a esta



solução 0,375 ml de formol a 35 % , no momento do uso, lavando-se novamente como descrito anteriormente. A revelação foi feita utilizando-se 3,0 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (carbonato de sódio) em 50 ml de água bi-destilada contendo 25  $\mu\text{l}$  de formol a 35 % e 1 ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  até o aparecimento de cor. Todos os reagentes utilizados nesse processo foram de procedência da Merck, Germany.

Lavou-se com água bi-destilada duas vezes durante 20 segundos, e a reação foi interrompida com uma solução de 50 % metanol e 12 % ácido acético glacial.

O gel foi submetido à secagem durante dois dias, à temperatura ambiente, entre folhas de papel celofane, aderido a um suporte de vidro.

### **3.9. Testes Imunológicos**

#### **3.9.1. Titulação do Conjugado IgG de Coelho anti-IgG Humana-Peroxidase para o Teste ELISA**

O conjugado IgG de coelho anti-IgG humana-peroxidase foi titulado com amostras de LCR controles positivo e negativo, no teste ELISA, variando a concentração dos antígenos em: 10  $\mu\text{g}$  / ml, 20  $\mu\text{g}$  / ml e 40  $\mu\text{g}$  / ml .As amostras de LCR foram diluídas 1/5 em PBS-T 0,05 % e controles com o diluente. O conjugado foi diluído 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/300, 1/400 em PBS-T 0,05 %:. Uma vez escolhido o título ótimo, realizou-se o teste ELISA das amostras.

### 3.9.2. Teste Imunoenzimático ELISA para Detecção de Anticorpos IgG Anti-metacestódeos de *T. solium* e de *T. crassiceps* em Amostras de LCR

Os testes ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* e *T. crassiceps*, em amostras de LCR, foram realizados conforme protocolo padronizado por COSTA *et al.* (1982) utilizando antígenos de *T. solium*, com algumas modificações. Foram usadas placas de poliestireno (Interlab, São Paulo, Brasil) como suporte para a adsorção do extrato salino total e do extrato SDS das formas larvárias, homólogas e heterólogas. As placas foram sensibilizadas a 4°C durante 18 horas, em câmara úmida, com 50 µl de solução dos antígenos, na concentração de 10 µg / ml, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6. Após este período e três lavagens de 5 minutos em PBS adicionado de Tween 20 a 0,05% (PBS-T) (Sigma, P 1379); adicionou-se 50 µl de amostras de LCR não diluídas e diluídas em PBS-T a 1/5, incubou-se por 45 minutos a 37°C, em câmara úmida. Em todas as placas foram incluídos controles da reação que consistiram de uma amostra de LCR positivo em testes ELISA anteriormente realizados e três LCR negativos para o mesmo teste. Após as três lavagens das placas em PBS-T adicionou-se 50 µl do conjugado IgG de coelho anti IgG humana-peroxidase, diluído em PBS-T no título ideal para os extratos heterólogos e homólogos. Incubou-se novamente por 45 minutos a 37°C, em câmara úmida.

Após três lavagens a reação foi revelada utilizando como substrato a solução de 50µl de orto-fenilenodiamina (OPD) (Merck, Germany) preparado no momento do uso (5 mg de OPD + 12,5 ml de tampão citrato fosfato pH 5,0 + 5µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%), (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merck, Germany). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz a reação foi interrompida pela adição de 25µl de solução 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Germany) e os valores

de absorbância foram determinados a 492 nm em leitor de microplacas de ELISA ( Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA). O limiar de reatividade foi calculado pela média aritmética das densidades ópticas das três amostras de LCR padrão negativos, acrescidas de 2 desvios padrões (BASSI *et al*, 1991).

### **3.9.3. Eletroforese em gel de Poliacrilamida e o Teste de “Western Blotting” para o Diagnóstico de Neurocisticercose Humana**

#### **3.9.3.1. Titulação do Conjugado IgG de Coelho anti-IgG Humana-Peroxidase pelo Teste ELISA para a Aplicação do Teste “Western Blotting”**

Preparou-se outro lote de conjugado IgG de coelho anti-IgG humana-peroxidase, utilizando-se os mesmos reagentes e procedimentos descritos anteriormente. Realizou-se à seguir a titulação do conjugado obtido frente a duas amostras de LCR positivas para neurocisticercose e duas negativas para esta parasitose e, controles somente de diluente para cada antígeno utilizando-se o teste ELISA, conforme descrito anteriormente. O conjugado foi testado nas diluições: 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600 em PBS-T 0,05 %. Os LCR foram diluídos 1/5 em PBS-T 0,05 % e, os quatro extratos antigênicos foram utilizados na concentração de 10 µg/ml diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). O título ideal foi escolhido após análise comparativa das densidades ópticas das amostras, sendo que para o teste “Western Blotting” adotou-se um título 10 (dez) vezes menor do que o obtido pelo teste ELISA.

### 3.9.3. 2. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil de proteínas dos metacestódeos, homólogo e heterólogo, reconhecidas pelos anticorpos presentes nas amostras de LCR foi analisado pela técnica de “Western Blotting”. Para isto, amostras dos quatro extratos antigênicos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12 % segundo LAEMMLI (1970).

Os géis de separação e de empilhamento foram preparados conforme descrito no item 3.8.1 deste trabalho no volume ideal para a obtenção do gel na concentração de 12 %.

As placas foram montadas em cubas para eletroforese contendo o tampão Tris-glicina 0,025 M pH 8,3.

Os extratos antigênicos foram ajustados para se obter equivalência das concentrações protéicas para 850 µg/ml. Para os extratos salinos, homólogo e heterólogo, utilizou-se 250 µl diluído volume a volume (v/v) em tampão de amostra, sem β- mercaptoetanol (agente redutor), e como as amostras de extratos SDS de ambas espécies já se encontravam diluídas em tampão de amostra, utilizou-se 250 µl. As quatro alíquotas de antígenos foram submetidas a um aquecimento de 100° C em banho-maria durante três minutos. À seguir estas amostras foram aplicadas, uma para cada gel preparado, no poço único do gel paralelamente a padrões de alto e baixo peso molecular.

Os padrões de pesos moleculares foram obtidos do “Kit Electrophoresis calibration for molecular weight proteins” (Sigma, M 3913 e M3788), cujas proteínas foram citadas anteriormente.

A corrente inicial da eletroforese foi de 20 mA e voltagem constante de 250 V, sendo aumentada para 25 mA quando as proteínas atingiram a linha correspondente ao início do gel de separação.

### 3.9.3.3. Reação de “Western Blotting”

Após a migração eletroforética das proteínas realizou-se a transferência destas para membranas de nitrocelulose 0,45 $\mu$ m (Hybond-C Amersham, Life Science) de acordo com as técnicas descritas por TOWBIN, STAEHELIN e GORDON (1979) com modificações. Foi preparado um “sandwich” utilizando-se 12 folhas de papel de filtro (Munktell, Grau 1F, Pharmacia - LKB, Suécia) recortadas com a mesma medida de área do gel; membrana de nitrocelulose e o gel de poliacrilamida contendo as frações antigênicas, sendo a transferência efetuada em sistema semi-úmido, utilizando-se o equipamento Multiphor II Electrophoresis Unit (Pharmacia - LKB, Suécia).

As folhas de papel de filtro e a membrana de nitrocelulose (10x15cm = 150cm<sup>2</sup>) foram umedecidos em tampão de transferência. Primeiramente, seis folhas de papel de filtro foram colocadas uma sobre a outra na cuba de transferência previamente umedecida com água destilada. Em seguida, colocou-se a membrana de nitrocelulose, o gel e as outras seis folhas de papel de filtro, cuidadosamente, para evitar-se a formação de bolhas de ar. A este material foi aplicada uma corrente elétrica de 0,8 mA por cm<sup>2</sup>, durante duas horas. Após a transferência, a nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S (Merck, Germany) a 0,5 % em ácido acético a 1 % a fim de verificar-se a eficiência da transferência.

A membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras, de aproximadamente 3 mm de largura, e seus sítios ativos foram bloqueados com uma solução de PBS a 0,05 % de Tween 20 (PBS-T) adicionada de 5 % de leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) durante duas horas, a temperatura ambiente e sob agitação lenta. Um volume de 500  $\mu$ l das amostras de LCR diluídas 1/5 em PBS-T adicionada de 1 % de leite desnatado, foi adicionado às tiras de nitrocelulose, paralelamente a amostras padrões positiva e negativa de

LCR, testados previamente por ELISA. As tiras foram incubadas por 18 horas a 4° C, sob agitação lenta e contínua em câmara úmida e posteriormente submetidas a 6 ciclos de lavagens durante cinco minutos cada, com PBS-T acrescido de 1 % de leite desnatado. Às tiras que receberam amostras de LCR, adicionou-se 500µl do conjugado IgG de coelho anti-imunoglobulina G humana marcado com peroxidase diluído no título ideal em PBS-T acrescido de 1 % de leite desnatado. A reação foi incubada por duas horas à temperatura ambiente sob agitação lenta e contínua. As tiras foram submetidas a 6 lavagens de 5 minutos cada em PBS (pH 7,2) e a reação foi revelada com 500 µl da solução contendo 2,5 mg de 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D 8001) diluídos em 15 ml de PBS e 225 µl de solução a 30 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Após o aparecimento de bandas de coloração marrom, cerca de 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de água destilada por quatro vezes nas canaletas contendo as tiras de nitrocelulose, aspirando-se em seguida. As tiras foram submetidas a secagem a temperatura ambiente, e posteriormente coladas em folha sulfite.

### **3.10. Normas De Biossegurança**

Todo o procedimento de colheita, manuseio do material biológico e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis segundo CHAVES-BORGES, MINEO (1997).

### **3.11. Análise Estatística**

A análise estatística dos resultados do Teste ELISA foi feita em termos de porcentagem de positividade e de negatividade do teste para as amostras de LCR testadas frente aos extratos antigênicos estudados.

O peso molecular das bandas foi estimado a partir da curva de regressão linear construída pelos valores dos pesos moleculares dos marcadores x o Rf (motilidade relativa), obtido através da fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distância da origem à migração}}{\text{Distância da origem ao ponto de referência}}$$

Para a interpretação dos resultados do teste “Western Blotting” utilizou-se o programa de computação “Statistic for Windows-Release versão 4.5 A” (Statesoft, Inc., 1993), sendo que o teste realizado foi o de análise comparativa entre duas proporções e os cálculos das significâncias entre as diferentes frequências incluíram um erro máximo de 5% ( $p \leq 0,05$ ). A hipótese nula foi aceita quando  $p \geq 0,05$  (5%).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtenção e Caracterização dos Extratos Antigênicos Salino e SDS, Homólogo e Heterólogo

Foram utilizados dois métodos de extração de antígenos: salino e SDS, empregando-se metacestódeos de duas espécies de parasitos: *T. solium* (homólogo) e *T. crassiceps* (heterólogo). Os rendimentos protéicos dos extratos obtidos estão demonstrados na Tabela 1, onde observamos que a extração por SDS apresentou maior índice de proteínas em comparação com o método salino para ambas as espécies: 5,4 vezes mais na heteróloga e 4,7 vezes mais na homóloga. O índice de polissacárides foi mais elevado nos extratos heterólogos em comparação com os homólogos..

Os extratos antigênicos obtidos foram submetidos a separação de peptídeos por SDS-PAGE a 12 % e coloração por nitrato de prata. Na figura 1 observamos que o método de extração salino mostrou maior densidade de bandas, tanto na espécie homóloga quanto na heteróloga, em comparação aos extratos SDS.

Tabela 1 - Determinação da concentração de proteínas e de polissacárides dos extratos salino e SDS obtidos de metacestódeos de *T. solium* (homólogo) e de metacestódeos de *T. crassiceps* (heterólogo).

Extratos Antigênicos	Proteínas (µg/ml)*	Polissacárides (µg/ml)*
Salino homólogo	1950	552
Salino heterólogo	410	920
SDS homólogo	4500	370
SDS heterólogo	2200	1000

\* valor médio calculado a partir de duas dosagens, para dois lotes de cada extrato antigênico.



kDa

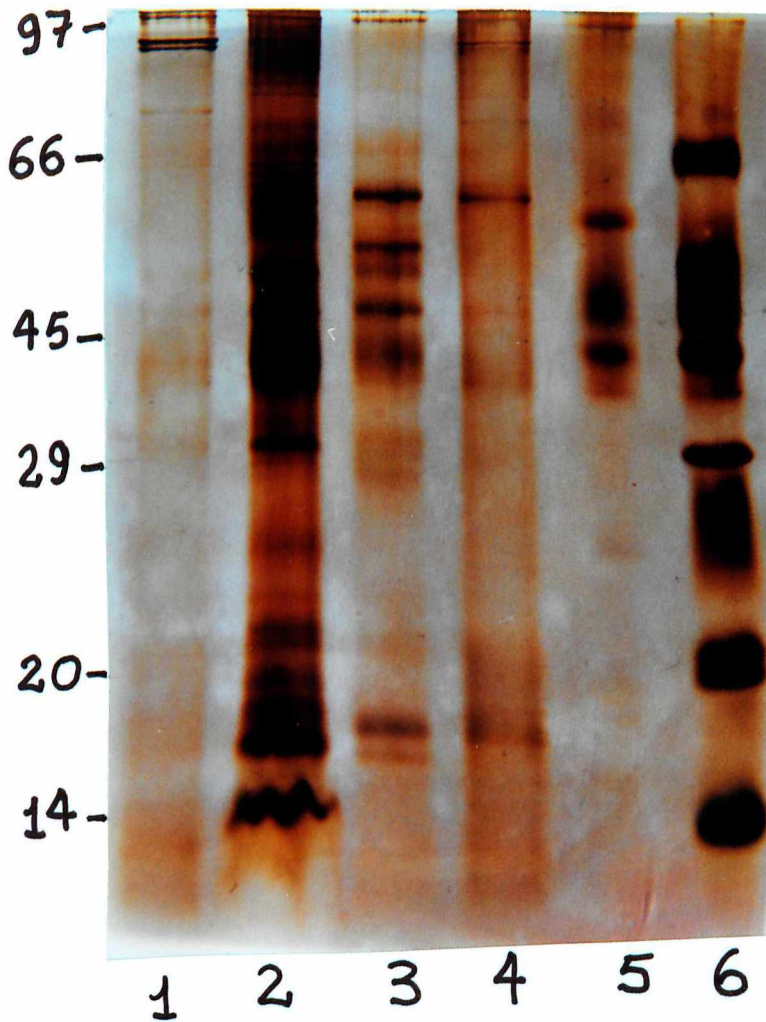


Figura 1 - Análise eletroforética de antígenos de metacestódeos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo), obtidos por diferentes métodos de extração (salino e SDS); através de SDS-PAGE a 12 % de concentração. Coloração por nitrato de prata (concentração protéica: 4µg/coluna). Colunas: 1 - Extrato SDS heterólogo; 2 - Extrato Salino heterólogo; 3 - Extrato Salino homólogo; 4 - Extrato SDS homólogo; 5 - Marcadores de altos pesos moleculares e 6 - Marcadores de baixos pesos moleculares. KDa; kilo Daltons; SDS: Sulfato Duodecil de Sódio;

## 4.2. Ensaaios Imunoenzimáticos

### 4.2.1. Padronização do Teste ELISA

O Teste ELISA foi padronizado utilizando-se três concentrações protéicas dos extratos obtidos: 10, 20 e 40  $\mu\text{g/ml}$  e amostra de LCR padrão reagente e não reagente para neurocisticercose, diluídos 1/5, incluindo controles: poços somente com o diluente do espécime sem extratos antigênicos, e poços com o diluente e com as diferentes concentrações dos extratos antigênicos (as diluições do conjugado foram adicionadas em todos os controles). As diluições testadas do conjugado IgG de coelho anti-IgG humana marcada com peroxidase foram as seguintes: 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/300, 1/400. Nas Figuras 2, 3, 4 e 5 estão demonstrados os resultados destas padronizações, onde se observa que a concentração proteica de 10  $\mu\text{g/ml}$  apresenta boa discriminação entre amostras de LCR reagente e não reagente reconhecidas pelo anticorpo secundário presente no conjugado, aliado a economia de reagentes. O título ótimo do conjugado imunoenzimático escolhido foi 1/150 para a espécie homóloga e 1/100 para a heteróloga, pois possibilitaram melhor discriminação de LCR reagente e não reagente no ensaio. A placa de microtitulação teve melhor desempenho técnico com estas diluições dos extratos e do conjugado.

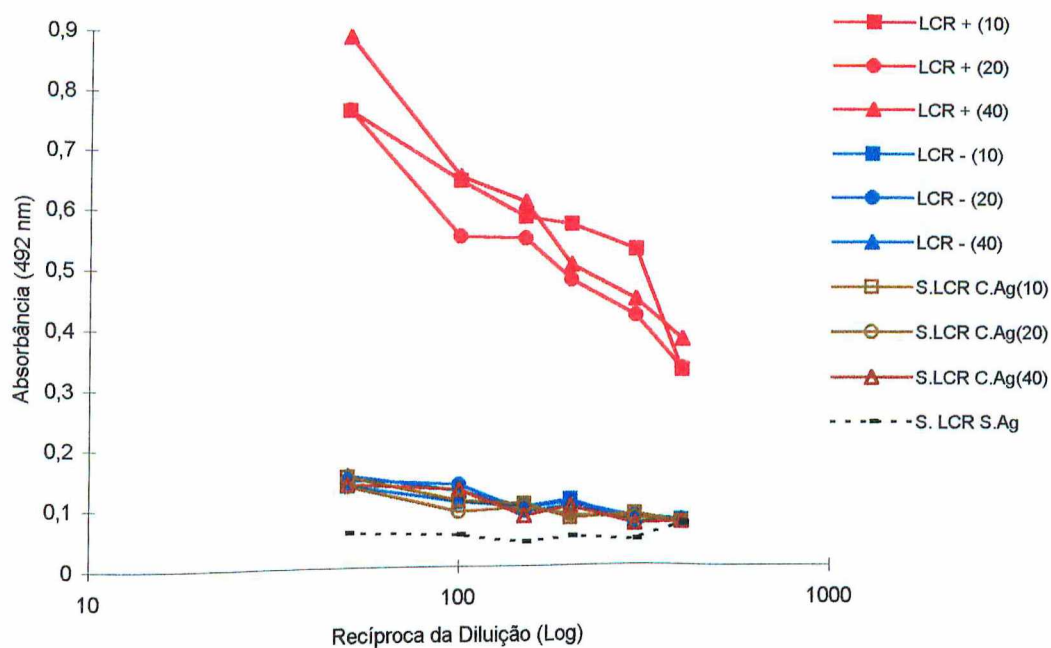


Figura 2 - Curva de reatividade do Teste ELISA em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) padrão reagente (LCR +) e não reagente (LCR -) para neurocisticercose, diluídos 1/5, frente ao extrato salino utilizando metacestódeos de *T. solium* nas concentrações: 10, 20 e 40  $\mu\text{g/ml}$ , S: sem; C: com; Ag: extrato. Utilizando-se diferentes títulos do conjugado IgG de coelho anti-IgG humana-peroxidase: 50, 100, 150, 200, 300 e 400.

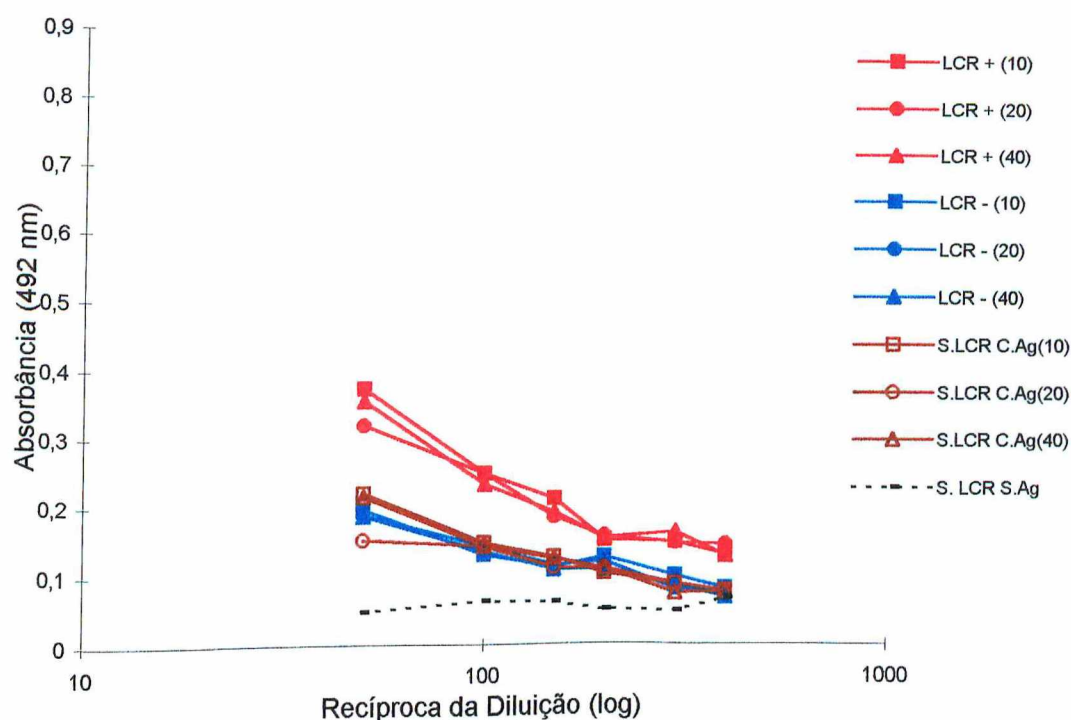


Figura 3 - Curva de reatividade do Teste ELISA em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) padrão reagente (LCR +) e não reagente (LCR -) para neurocisticercose, diluídos 1/5, frente ao extrato salino utilizando metacésteos de *T. crassiceps*, nas concentrações: 10, 20 e 40µg/ml; S: sem; C: com; Ag: extrato. Utilizando-se diferentes títulos do conjugado IgG de coelho anti-IgG humana-peroxidase: 50, 100, 150, 200, 300 e 400.

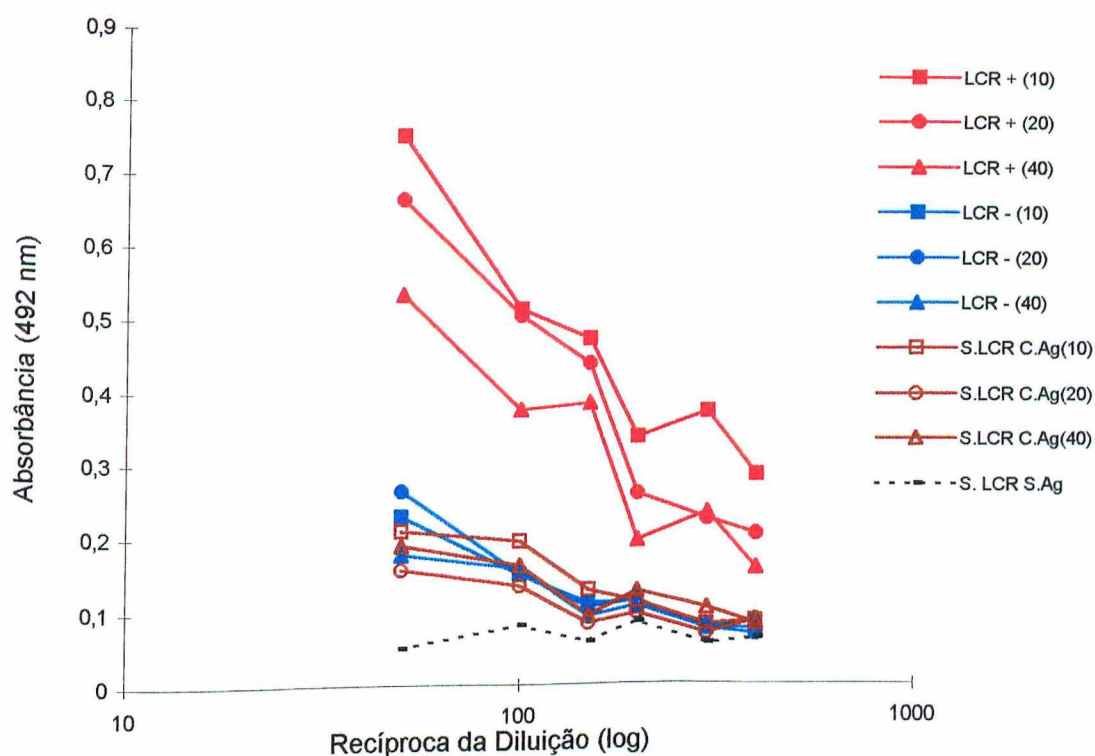


Figura 4 - Curva de reatividade do Teste ELISA em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) padrão reagente (LCR +) e não reagente (LCR -) para neurocisticercose, diluídos 1/5, frente ao extrato SDS utilizando metacestódeos de *T. solium*, nas concentrações: 10, 20 e 40 µg/ml; S: sem; C: com; Ag: extrato. Utilizando-se diferentes títulos do conjugado IgG de coelho anti-IgG humana-peroxidase: 50, 100, 150, 200, 300 e 400 SDS: sulfato duodecil de sódio..



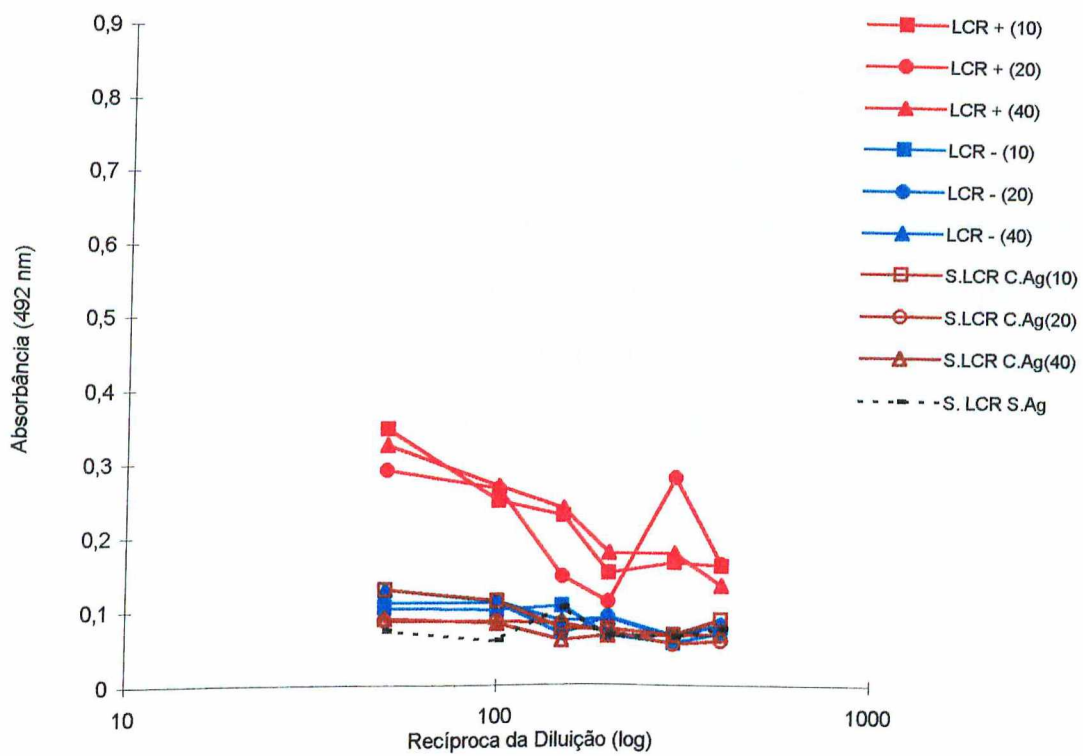


Figura 5 - Curva de reatividade do Teste ELISA em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) padrão reagente e não reagente para neurocisticercose, diluídos 1/5, frente ao extrato SDS utilizando metacestódeos de *T. crassiceps*, nas concentrações: 10, 20 e 40µg/ml. Utilizando-se diferentes títulos do conjugado IgG de coelho anti-IgG humana-peroxidase: 50, 100, 150, 200, 300 e 400. SDS: Sulfato Duodecil de Sódio..

#### 4.2.2. Padronização do Teste “Western Blotting”

O teste “Western Blotting” foi padronizado utilizando-se um segundo lote de conjugado IgG de coelho anti-IgG humana marcado com peroxidase. A titulação do conjugado foi realizada através do teste ELISA IgG frente a amostras de LCR, diluídas 1/5, duas reagentes e duas não reagentes para neurocisticercose. A concentração protéica dos extratos foi de 10 µg/ml (anteriormente definido). Assim para os extratos homólogos obteve-se a diluição ótima de 1/800 e para os extratos heterólogos de 1/100. Nas reações de “Western Blotting” o conjugado foi utilizado numa diluição aproximadamente 10 vezes menor que os obtidos pelo ELISA, ou seja, 1/100 para os extratos homólogos e 1/20 para os heterólogos.

Na Figura 6 temos a padronização do teste de “Western Blotting”, onde foram utilizados os controles de LCR reagentes e não reagentes; controles somente com o diluente do espécime e o conjugado nas diluições definidas para os extratos antigênicos de cada espécie parasito.

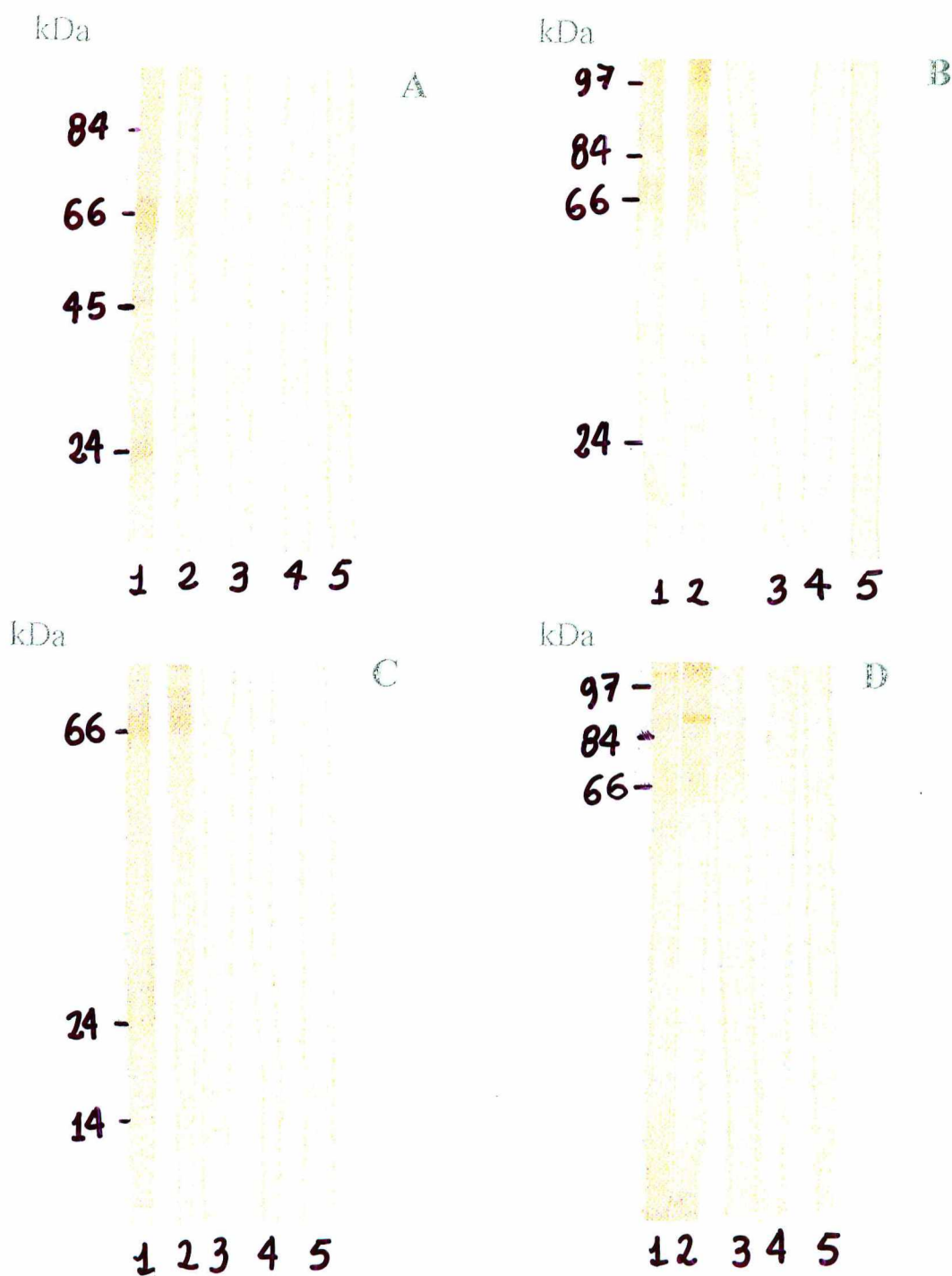


Figura 6 - "Immunoblotting" da padronização do conjugado IgG de coelho anti-IgG humana-peroxidase frente a amostras de líquido cefalorraquidiano, diluídas 1/5, padrão reagentes (1 e 2) e padrão não-reagentes (3 e 4) para neurocisticercose; e controles sem adição de amostra (5). Utilizando os extratos (proteínas: 850µg/ml) de metacestódeos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo): A - salino homólogo; B - salino heterólogo; C - SDS homólogo; D - SDS heterólogo. Títulos do conjugado: 100 (extratos homólogos) e 20 (extratos heterólogos). SDS: Sulfato Duodecil de Sódio. kDa: kilo Daltons.



### **4.3. Detecção de Anticorpos IgG Anti-Neurocisticercose Humana em Amostras de LCR frente aos Quatro Extratos Antigênicos através dos Testes ELISA e "Western Blotting"**

#### **4.3.1. Sensibilidade e Especificidade do Teste ELISA**

Nas Figuras 7 e 8 temos a sensibilidade e especificidade, respectivamente, dos testes ELISA realizados frente aos quatro extratos antigênicos obtidos. Para o cálculo da sensibilidade e da especificidade considerou-se as frequências de positividade e de negatividade dos grupos de LCR reagente ( $n=40$ ) e não reagente ( $n=39$ ) respectivamente. A sensibilidade do ensaio para o extrato salino homólogo foi de 100 %, teste de referência, do salino heterólogo foi de 85 %, 95 % para o extrato SDS homólogo e de 87,5 % para o SDS heterólogo. A especificidade foi de: 100 % para cada extrato analisado. Não houve diferença estatística significativa entre os métodos de extração antigênica salino e SDS na sensibilidade e especificidade do teste; as espécies parasitos (homóloga e heteróloga) utilizadas no teste ELISA apresentaram resultados similares de sensibilidade e especificidade ( $p>0,05$ ).

O limiar de reatividade do teste ELISA foi calculado para cada reação realizada conforme descrito em material e métodos, na Tabela 2 temos os valores das absorbâncias dos controles negativos de cada reação frente aos quatro extratos testados e o limiar de reatividade ("cut-off") para cada extrato, calculado utilizando-se a média das absorbância de três amostras de LCR, de referência, não reagentes para neurocisticercose acrescidos de dois desvios padrão.

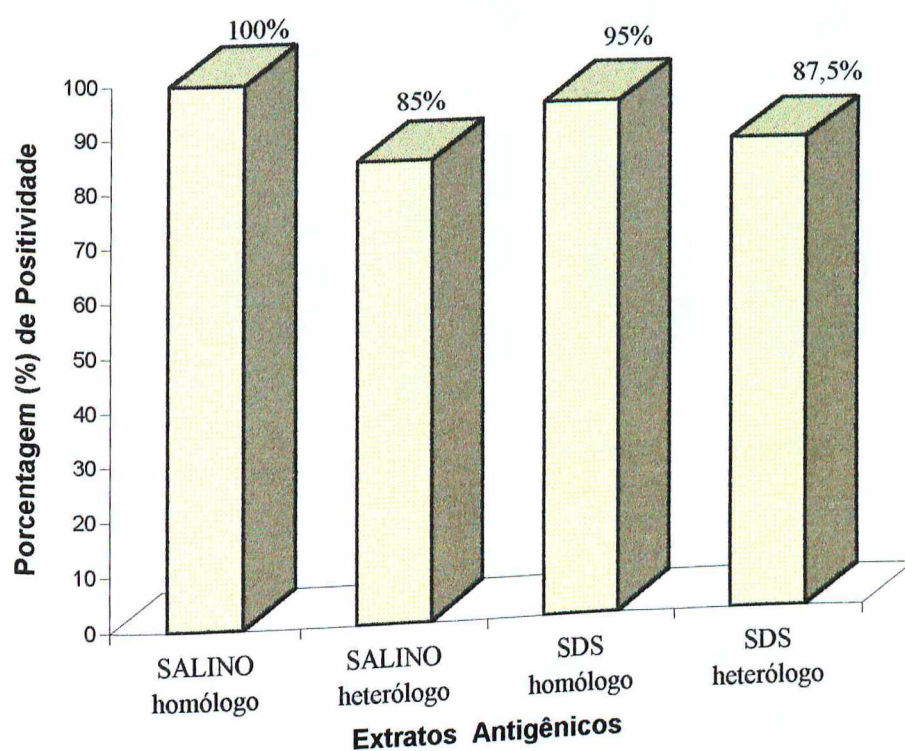


Figura 7 - Sensibilidade do Teste ELISA IgG em 40 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose frente aos quatro extratos antigênicos: salino e SDS utilizando-se metacestódeos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo); para o cálculo da diferença entre duas proporções foi considerado erro máximo de 5% ( $p \leq 0,05$ ). SDS: Sulfato Duodecil de Sódio.

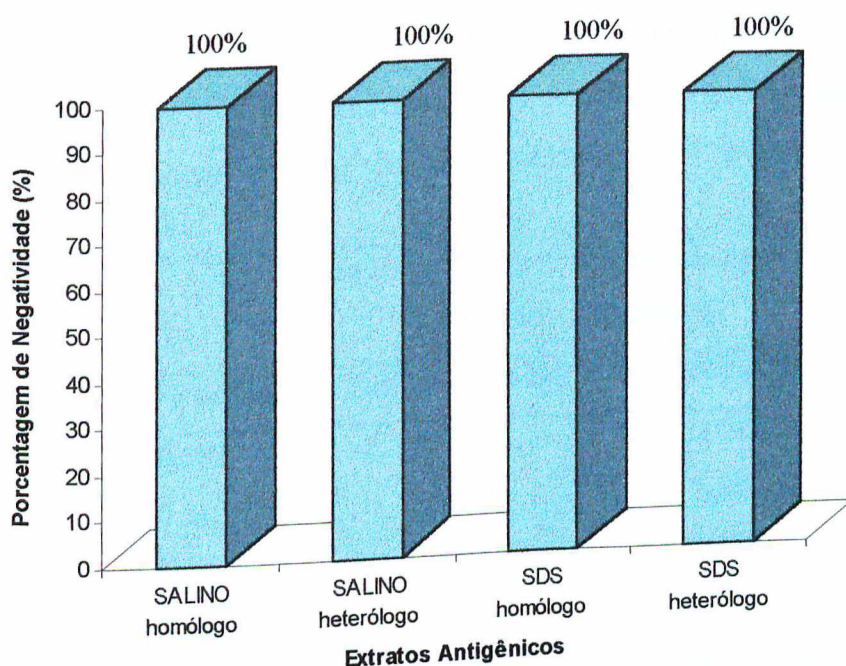


Figura 8 - Especificidade do Teste ELISA IgG em 39 amostras de LCR de pacientes com alterações neurológicas, excluindo neurocisticercose, frente aos quatro extratos antigênicos: salino e SDS utilizando-se metacestódeos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo); para o cálculo da diferença entre duas proporções foi considerado erro máximo de 5% ( $p < 0,05$ ). SDS: Sulfato Duodecil de Sódio.

Tabela 2 -Limiar de Reatividade do Teste ELISA IgG em 84 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose e controles, para quatro extratos antigênicos: salino e SDS utilizando-se metacestódeos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo). SDS: Sulfato Duodecil de Sódio.

Reação ELISA	Limiar de Reatividade * (densidade óptica a 492 nm)			
	Extratos Antigênicos			
número	Salino Homólogo	Salino Heterólogo	SDS Homólogo	SDS Heterólogo
1	0,181	0,174	0,242	0,122
2	0,212	0,251	0,187	0,286
3	0,154	0,196	0,136	0,104
4	0,193	0,211	0,254	0,342

\* cálculo a partir da média das densidades ópticas de três amostras de LCR não reagentes para neurocisticercose, de referência, acrescida de dois desvios padrão

#### 4.3.2. Análise dos Marcadores Antigênicos Reconhecidos por Amostras de LCR frente aos Extratos Antigênicos através do Teste "Western Blotting"

Do universo de 84 amostras de LCR estudadas foram testadas pelo "Western Blotting" 55 amostras; destas 40 foram do grupo de diagnóstico comprovado de neurocisticercose, cinco de pacientes com suspeita clínica de neurocisticercose e 10 do grupo com outras alterações neurológicas.

Pelos resultados do teste de "Western Blotting" foram calculadas as frequências das bandas de pesos moleculares aparentes (kDa) reconhecidas pelos anticorpos IgG das amostras nos quatro extratos antigênicos utilizados. Estes resultados estão demonstrados nas Tabelas 3 e 4. Foram reconhecidas 15 bandas antigênicas: 8, 12-13, 18, 24, 26-28, 39-42, 45, 54, 64-68, 77, 83, 86, 88, 92-95 e 108-114kDa. As dez amostras do grupo de outras alterações neurológicas não reconheceram marcadores antigênicos em nenhum extrato testado.

Após os cálculos das frequências das bandas, foram realizadas análises comparativas entre duas proporções para os dois métodos de extração: salino e SDS, e para cada espécie de parasito (homóloga e heteróloga) frente aos dois métodos de extração. A significância entre as diferenças de duas proporções foi definida para erro máximo de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

Na Figuras 9 está demonstrada a frequência de reconhecimento dos marcadores de pesos moleculares aparentes pelas amostras de LCR testadas, utilizando o extrato salino, onde se observa diferenças estatisticamente significantes entre as espécies homóloga e heteróloga nos seguintes marcadores: 8, 18, 24, 45, 54, 83, 86, 88, 92-95 e 108-114 kDa (painel A). Duas bandas antigênicas foram exclusivas: 24 kDa no extrato homólogo e a de 83 kDa no heterólogo. As bandas 26-28, 45 e 64-68 kDa (homólogo) e 88 e 108-114 kDa (heterólogo) (painel B) foram

reconhecidas por amostras de LCR de pacientes com suspeita clínica de neurocisticercose, com  $p < 0,05$ .

Na Figura 10 observa-se a frequência de reconhecimento dos marcadores antigênicos nas duas espécies parasitos quando utilizou-se a extração por SDS. As bandas 18, 54, 64-68, 77, 83, 86, 88 e 108-114 kDa (painel A) apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). As bandas exclusivas foram: 86 kDa no extrato homólogo e 83 e 88 kDa no heterólogo. A banda 64-68 kDa foi predominante no extrato homólogo. As bandas 24 e 45 não foram reconhecidas nos extratos SDS. As bandas: 64-68 e 77 kDa foram reconhecidas no grupo de cinco amostras com suspeita clínica ( $p < 0,05$ ).

A Figura 11 apresenta a frequência de marcadores antigênicos reconhecidos pelas amostras de LCR na espécie homóloga frente aos dois extratos testados: salino e SDS. As bandas imunodominantes (com frequência de reconhecimento igual ou acima de 40%) foram: 64-68 (60%) e 45 kDa (50%) e 64-68 (65%), 108-114 (50%), 77 (47,5%) e 86 (40%) kDa nos extratos salino e SDS respectivamente (painel A). E as bandas com diferença de frequência significativa foram: 12-13, 18, 24, 26-28, 45, 54, 86 e 92-95 kDa. Dentre estas bandas de pesos moleculares aparentes, as de 12-13, 24, 26-28, e 45 kDa foram reconhecidas somente no extrato salino e as bandas de 8 e 18 kDa somente no extrato SDS. No painel B observa-se que o reconhecimento dos marcadores: 26-28, 45 e 64-68 kDa no extrato salino homólogo; e os de 64-68 e 77 kDa no extrato SDS homólogo com  $p < 0,05$ .

Na Figura 12 está demonstrada a frequência de reconhecimento de marcadores de pesos moleculares aparentes pelas amostras de LCR na espécie heteróloga frente aos dois métodos de extração: salino e SDS. Foram imunodominantes as bandas de pesos moleculares aparentes: 108-114 (70%), 92-95 (55%), 83 e 64-68 (50% cada), e de 88 kDa (42,5%) no extrato salino; 108-114 (92,5%), 88 (82,5%) e 92-95 kDa (42,5%) no extrato

SDS (painel A). As bandas com diferença de frequência significativa foram: 12-13, 18, 45, 54, 64-68, 77, 88 e 108-114 kDa. Dentre estas as bandas de 12-13, 18, 45, 54, 64-68 e 77 kDa foram mais reconhecidas no extrato salino e as demais no SDS. No painel B observa-se o reconhecimento dos marcadores de 88 e 108-114 kDa no extrato salino heterólogo.

Tabela 3- Frequência das bandas antigênicas de metacestódeos de *Taenia solium* (homólogo) e de *Taenia crassiceps* (heterólogo) reconhecidas por 40 amostras de LCR com diagnóstico comprovado de neurocisticercose através do Teste "Western Blotting".

SDS: Sulfato Duodecil de Sódio. kDa: kilo Daltons.

BANDAS	EXTRATOS ANTIGÊNICOS							
	Salino		Salino		SDS		SDS	
	Homólogo		Heterólogo		Homólogo		Heterólogo	
	n	%	n	%	n	%	n	%
8	0	0	9	22,5	1	2,5	5	12,0
12-13	13	32,5	7	17,5	0	0	1	2,5
18	0	0	8	20,0	12	30,0	1	2,5
24	10	25,0	0	0	0	0	0	0
26-28	9	22,5	4	10,0	0	0	1	2,5
39-42	3	7,5	3	7,5	1	2,5	2	5,0
45	20	50,0	9	22,5	0	0	0	0
54	1	2,5	7	17,5	14	35,0	1	2,5
64-68	24	60,0	20	50,0	26	65,0	3	7,5
77	13	32,5	15	37,5	19	47,5	4	10,0
83	0	0	20	50,0	0	0	15	37,5
86	6	15,0	0	0	16	40,0	0	0
88	0	0	17	42,5	0	0	33	82,5
92-95	5	12,5	22	55,0	15	37,5	17	42,5
108-114	15	37,5	28	70,0	22	55,0	37	92,5

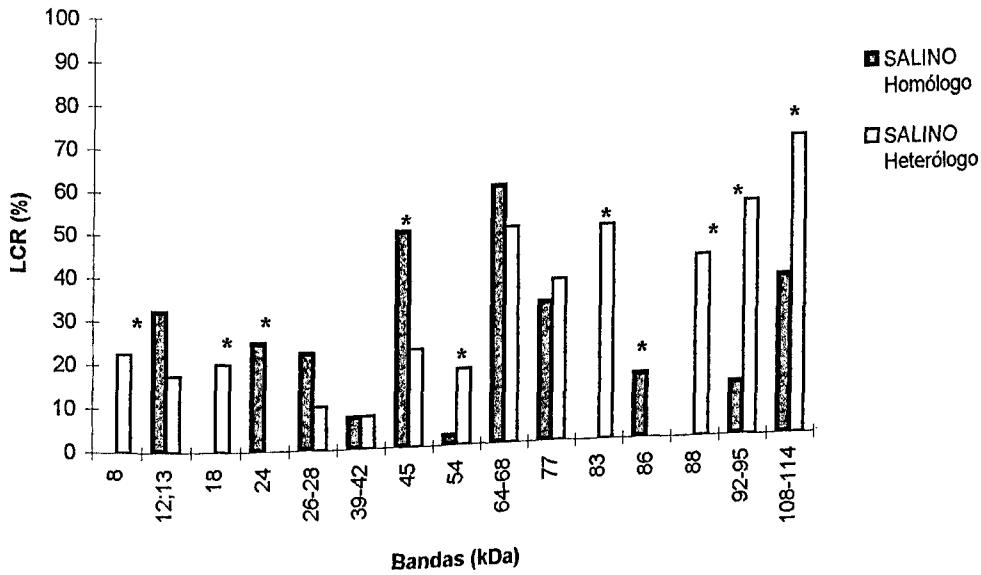


Tabela 4 - Frequência das bandas antigênicas de metacestódeos de *Taenia solium* (homólogo) e de *Taenia crassiceps* (heterólogo) reconhecidas por 5 amostras de LCR de pacientes com suspeita clínica de neurocisticercose, através do teste “Western Blotting”.

SDS: Sulfato Duodecil de Sódio. kDa: kilo Daltons.

BANDAS			EXTRATOS ANTIGÊNICOS					
Peso Molecular (kDa)	SALINO		SALINO		SDS		SDS	
	Homólogo		Heterólogo		Homólogo		Heterólogo	
	n	%	n	%	n	%	n	%
8	0	0	0	0	0	0	0	0
12-13	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0
26-28	1	20,0	0	0	0	0	0	0
39-42	0	0	0	0	0	0	0	0
45	1	20,0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0
64-68	2	40,0	0	0	2	40,0	0	0
77	0	0	0	0	1	20,0	0	0
83	0	0	0	0	0	0	0	0
86	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	1	20,0	0	0	0	0
92-95	0	0	0	0	0	0	0	0
108-114	0	0	2	40,0	0	0	0	0

A



B

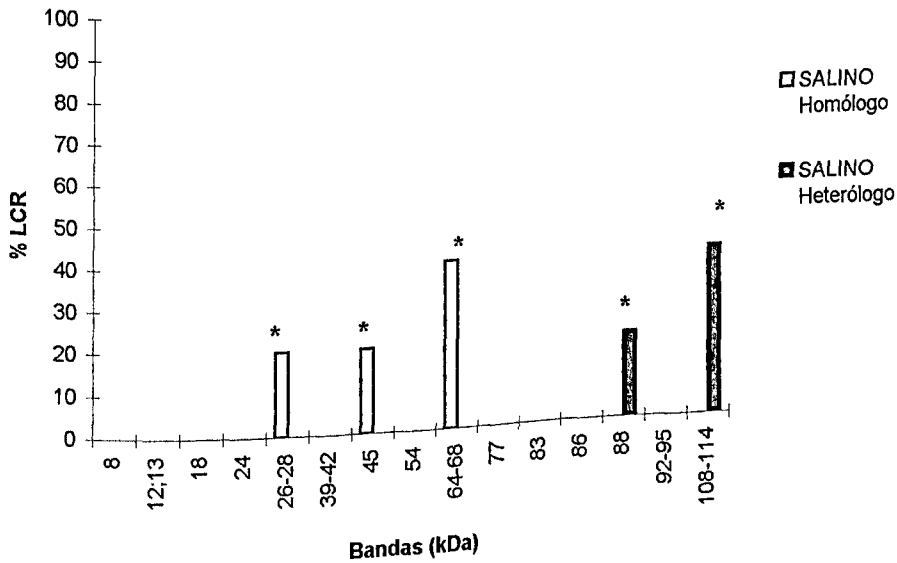
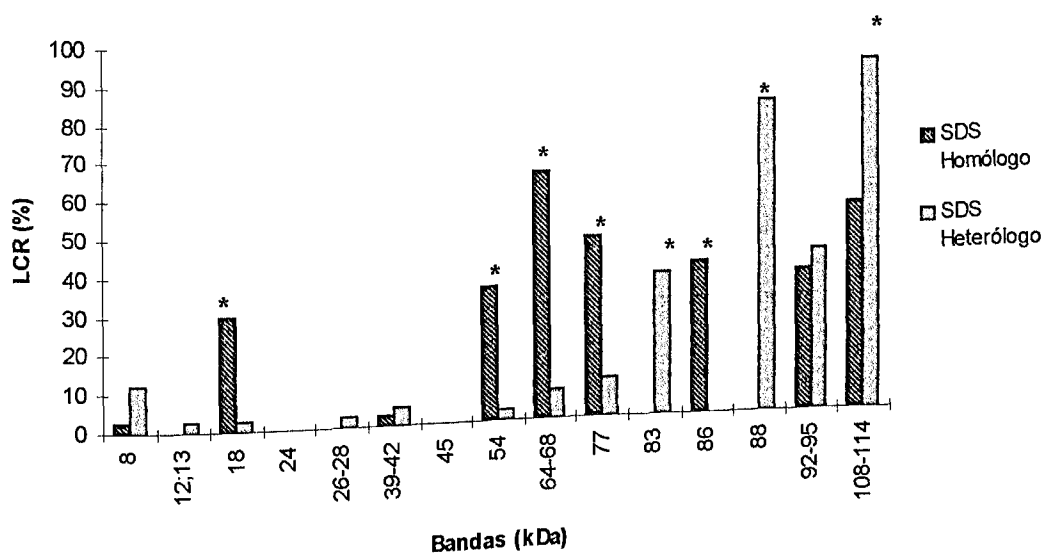


Figura 9 - Frequência do reconhecimento de marcadores antigênicos (kDa) de 45 amostras de líquido cefalorraquidiano, 40 com diagnóstico comprovado de neurocisticercose (NC) (Painel A) e de 5 com suspeita clínica de NC (Painel B); diluídas 1/5, testadas por "Western Blotting" para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*, frente aos extratos salinos utilizando metacestódeos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo). \* Diferença entre duas proporções significativa com erro máximo de 5% ( $p < 0,05$ ). SDS: Sulfato Duodecil de Sódio. kDa: kilo Daltons.

A



B

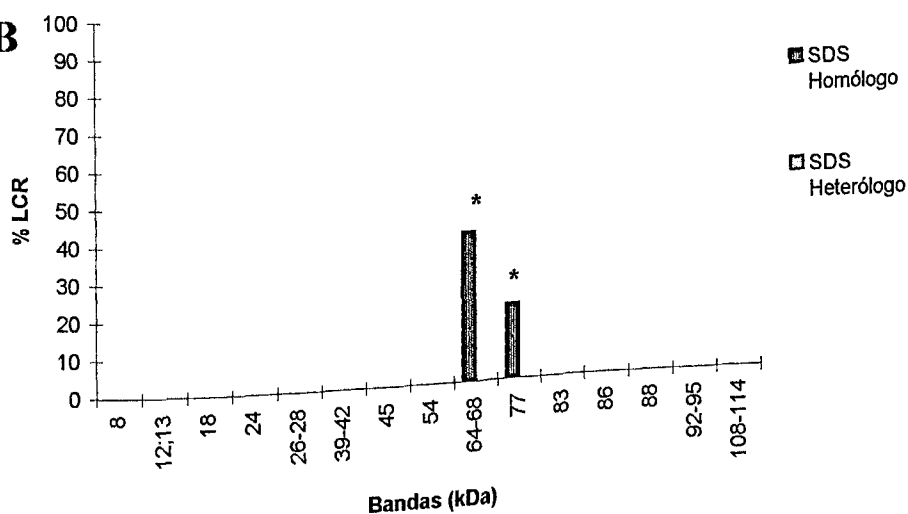


Figura 10 - Frequência do reconhecimento de marcadores antigênicos (kDa) de 45 amostras de líquido cefalorraquidiano, 40 com diagnóstico comprovado de neurocisticercose (NC) (Painel A) e de 5 com suspeita clínica de NC (Painel B); diluídas 1/5, testadas por "Western Blotting" para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*, frente aos extratos SDS utilizando metacestódeos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo). \* Diferença entre duas proporções significativa com erro máximo de 5% ( $p < 0,05$ ). SDS: Sulfato Duodecil de Sódio. kDa: kilo Daltons.

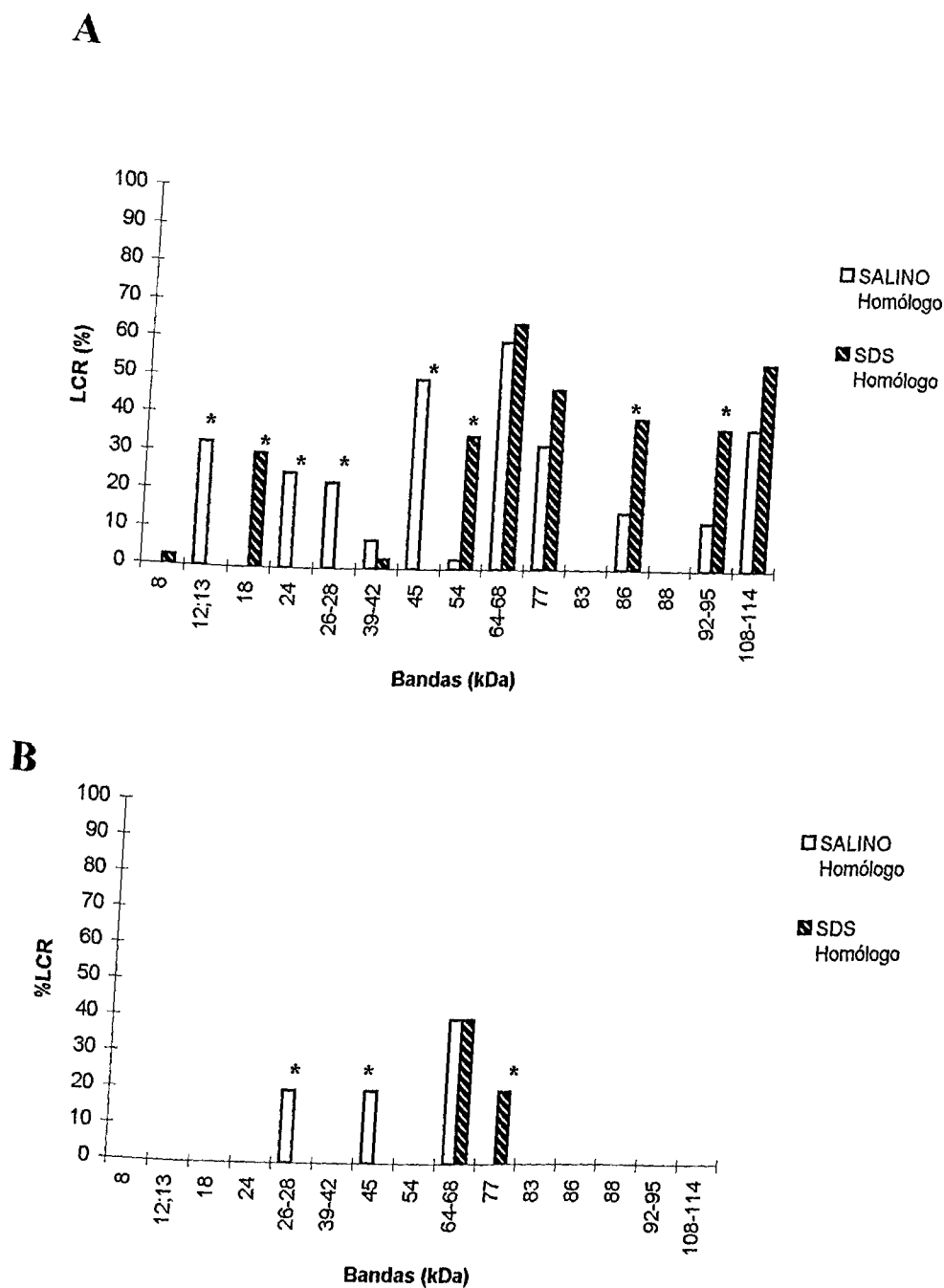
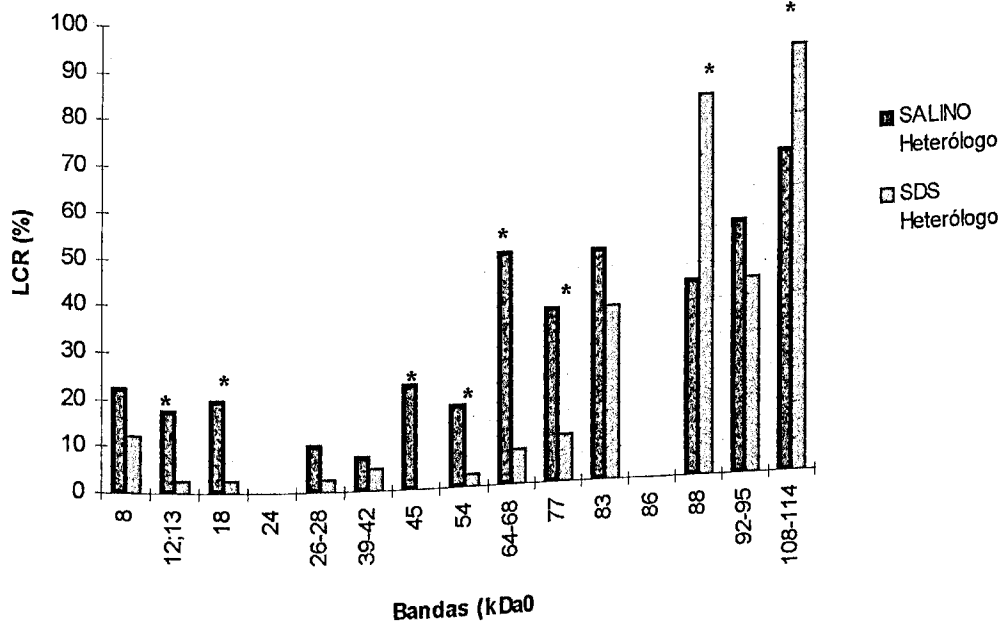


Figura 11 - Frequência do reconhecimento de marcadores antigênicos (kDa) de 45 amostras de líquido cefalorraquidiano, 40 com diagnóstico comprovado de neurocisticercose (NC) (Painel A) e de 5 com suspeita clínica de NC (Painel B); diluídas 1/5, testadas por "Western Blotting" para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*; utilizando metacestódeos de *T. solium* (homólogo) frente a dois métodos de extração antigênica: salino e SDS. \* Diferença entre duas proporções significativa com erro máximo de 5% ( $p < 0,05$ ). SDS: Sulfato Duodecil de Sódio. kDa: kilo Daltons.

A



B

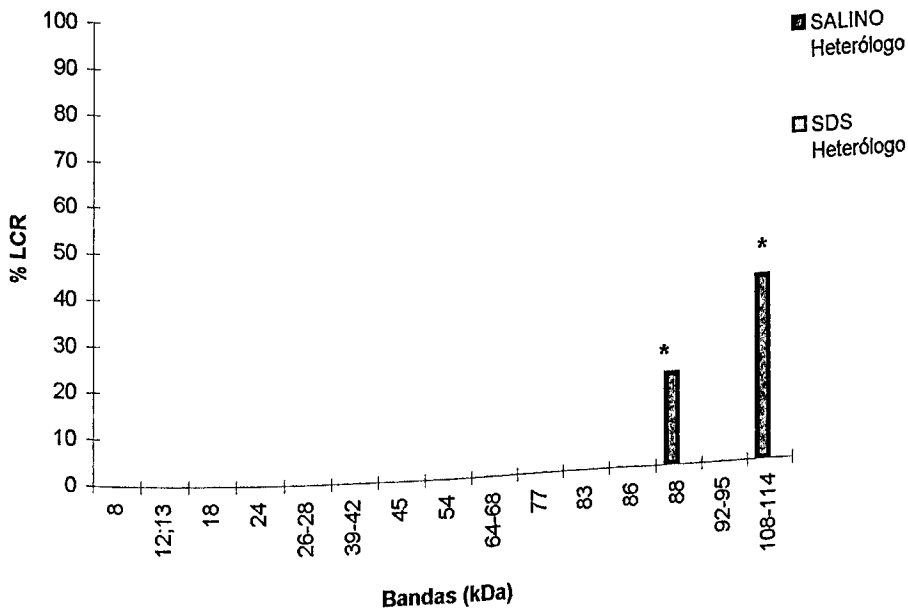


Figura 12 - Frequência do reconhecimento de marcadores antigênicos (kDa) de 45 amostras de LCR, 40 com diagnóstico comprovado de neurocisticercose (NC) (Painel A) e de 5 com suspeita clínica de NC (Painel B); diluídas 1/5, testadas por "Western Blotting" para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*; utilizando metacestódeos de *T. crassiceps* (heterólogo) frente a dois métodos de extração antigênica: salino e SDS. \* Diferença entre duas proporções significativa com erro máximo de 5% ( $p < 0,05$ ). SDS: Sulfato Duodecil de Sódio. kDa: kilo Daltons.

#### 4.4. Comparações entre os Testes ELISA e “Western Blotting” na - Detecção de Anticorpos IgG Anti-Neurocisticercose em Amostras de LCR frente aos Quatro Extratos Antigênicos Utilizados

Na Tabela 5 estão demonstrados os resultados comparativos entre os dois testes realizados, “Western Blotting” e ELISA, em 45 amostras de LCR, 40 com diagnóstico de neurocisticercose e cinco de pacientes com suspeita clínica da parasitose; frente aos quatro extratos antigênicos utilizados. Observa-se, nesta Tabela, que os resultados concordantes positivos, entre os dois testes, em amostras de pacientes com neurocisticercose, foram: 85%, 92,5%, 87,5% e 97,5% nos extratos: salino homólogo, salino heterólogo, SDS homólogo e SDS heterólogo, respectivamente ( $p>0,05$ ).

Os índices concordantes negativos entre os dois testes, nas amostras com neurocisticercose, os extratos homólogos não apresentaram nenhuma amostra não reagente simultaneamente pelos dois testes e, nos extratos heterólogos o índice foi de 2,5% de amostras não reagentes para cada.

As amostras que apresentaram resultados discordantes com “Western Blotting” reagente e ELISA não reagente, para neurocisticercose foram: 0%, 12,5%, 5% e 10% nos extratos: salino homólogo, salino heterólogo, SDS homólogo e SDS heterólogo, respectivamente ( $p<0,05$  entre 0% e 12,5%; 0% e 10%)

As amostras que apresentaram resultados discordantes com “Western Blotting” não reagente e ELISA reagente, no grupo com neurocisticercose, foram: 15%, 5%, 15% e 0% nos extratos: salino homólogo, salino heterólogo, SDS homólogo e SDS heterólogo respectivamente ( $p>0,05$ ).

No painel B da Tabela 5 observa-se que as cinco amostras de LCR com suspeita clínica de neurocisticercose foram reagentes pelo “Western Blotting” no extrato SDS homólogo, sendo duas com ELISA

reagente e três com ELISA não reagente; no extrato SDS heterólogo, as cinco amostras não apresentaram reatividade em nenhum dos testes empregados.

As Figuras 13 e 14 ilustram o padrão de reconhecimento de marcadores antigênicos por 10 amostras de LCR pertencentes ao grupo de 40 amostras de pacientes com neurocisticercose, frente aos quatro extratos utilizados.

Tabela 5 - Comparações entre os resultados dos testes: "Western Blotting" (WB) e ELISA em 45 amostras de líquido cefalorraquidiano, 40 de pacientes com neurocisticercose (painel A) e 5 com suspeita clínica de neurocisticercose (painel B); utilizando extratos de metacestódeos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo). SDS: Sulfato Duodecil de Sódio.

## A

Extratos Antigênicos	WB+ e	WB+ e	WB- e	WB- e
	ELISA+	ELISA-	ELISA+	ELISA-
Salino Homólogo	34 (85,0)	0 (0,0*,**)	6 (15,0)	0 (0,0)
Salino Heterólogo	37 (92,5)	5 (12,5*)	2 (5,0)	1 (2,5)
SDS Homólogo	35 (87,5)	2 (5,0)	6 (15,0)	0 (0,0)
SDS Heterólogo	39 (97,5)	4 (10,0**)	0 (0,0)	1 (2,5)

( ): porcentagem de concordância ou discordância entre os dois testes realizados.

\* \*\* Diferença significativa entre duas proporções com  $p \leq 0,05$ .

## B

Extratos Antigênicos	WB+ e	WB+ e	WB- e	WB- e
	ELISA+	ELISA-	ELISA+	ELISA-
Salino Homólogo	0 (0,0)	3 (60,0)	0 (0,0)	2 (40,0)
Salino Heterólogo	1 (20,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	1 (20,0)
SDS Homólogo	2 (40,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	0 (0,0)
SDS Heterólogo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (100,0)

( ): porcentagem de concordância ou discordância entre os dois testes realizados.



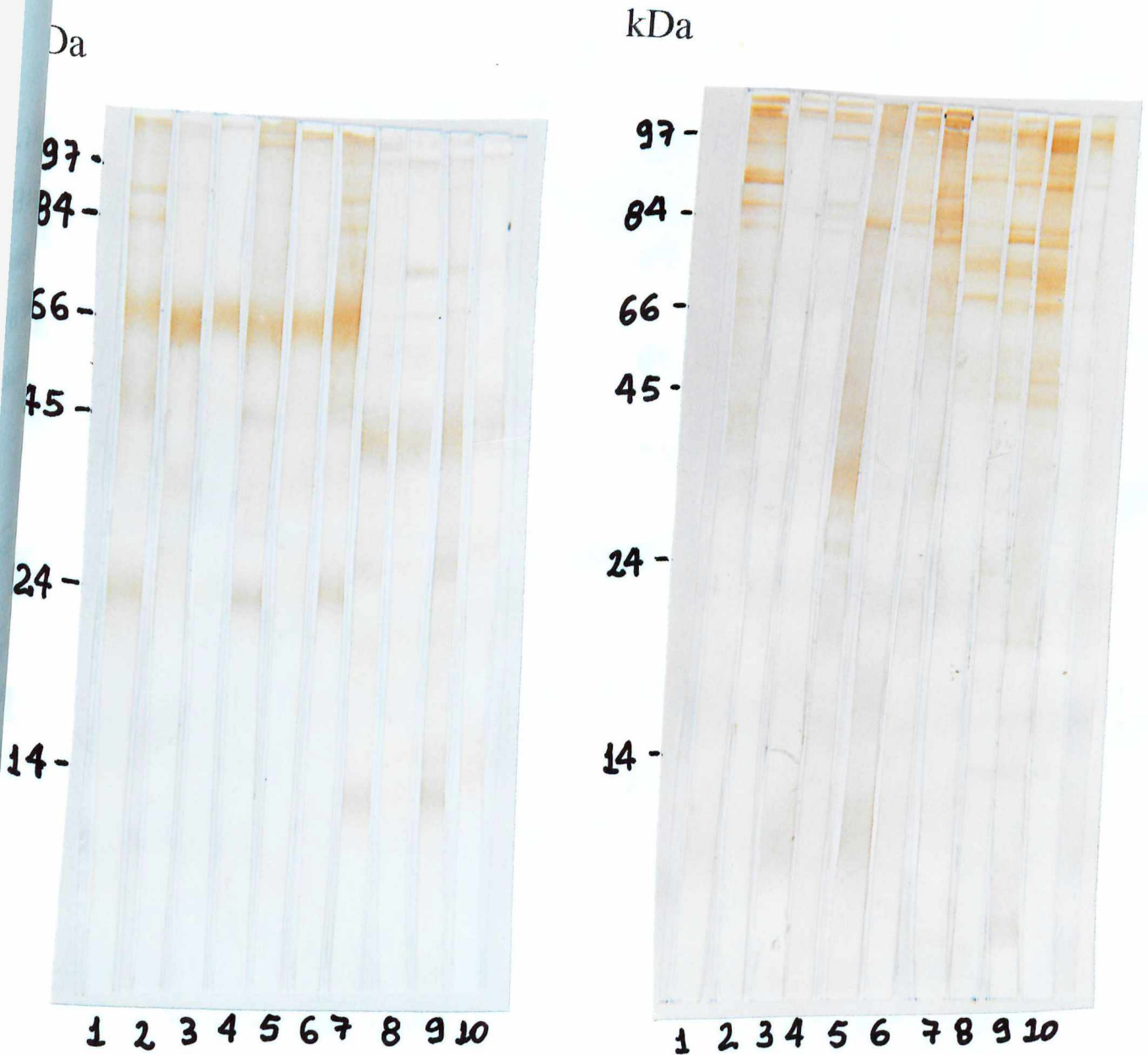


Figura 13 - "Immunoblot" de 10 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes do grupo de 40 amostras com neurocisticercose, diluídas 1/5. Título do conjugado: 100 (nos extratos homólogo) e de 20 (nos extratos heterólogos) Utilizando antígenos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo): A - extrato salino homólogo; B - extrato salino heterólogo. Concentração protéica dos extratos: 850µg/ml-. SDS: Sulfato Duodecil de Sódio; kDa: kilo Daltons.

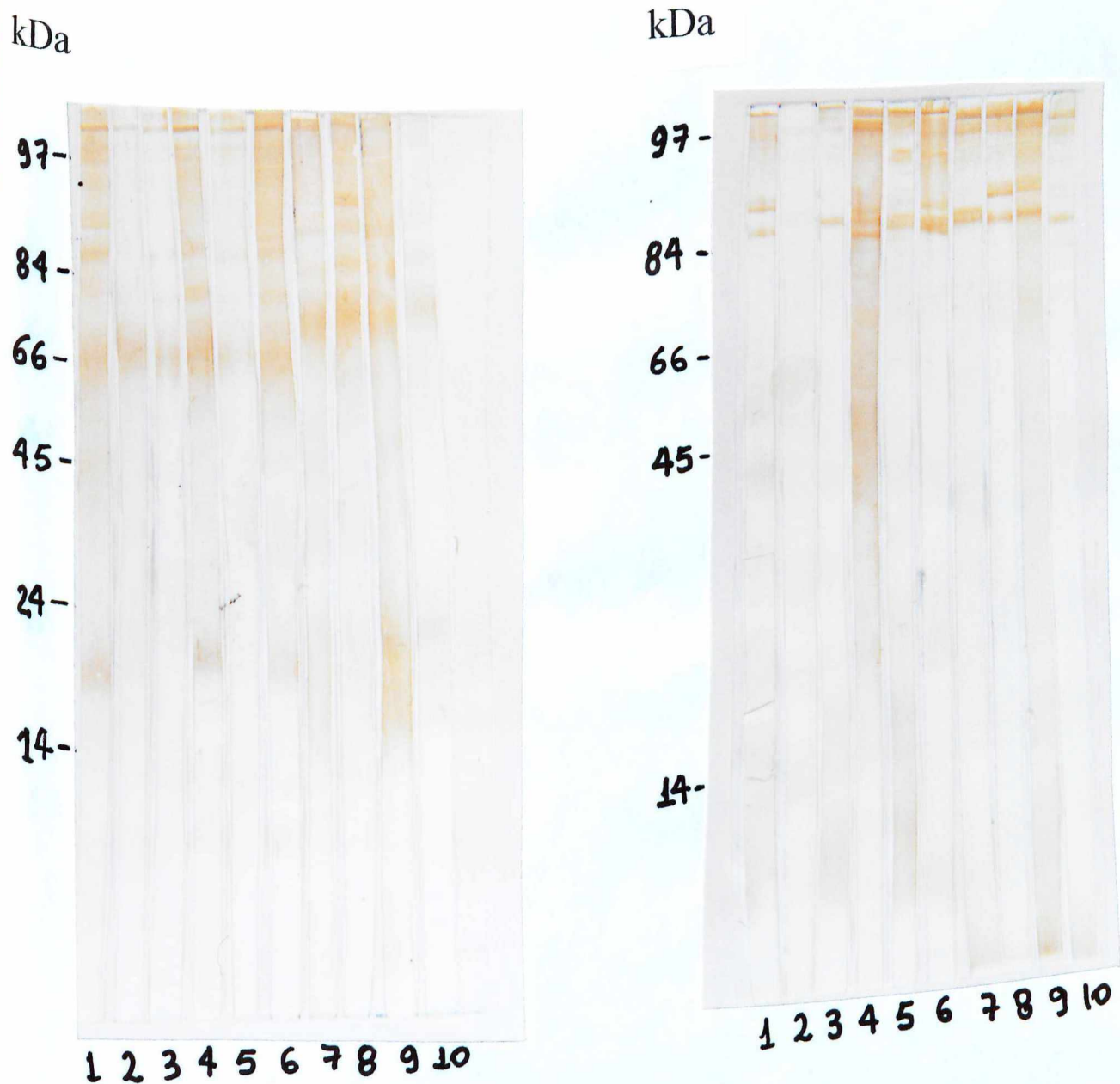


Figura 14 - "Immunoblot" de 10 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes do grupo de 40 amostras com neurocisticercose, diluídas 1/5. Título do conjugado: 100 (nos extratos homólogo) e de 20 (nos extratos heterólogos) Utilizando antígenos de *T. solium* (homólogo) e de *T. crassiceps* (heterólogo): A - extrato SDS homólogo; B - extrato SDS heterólogo. Concentração protéica dos extratos: 850µg/ml-. SDS: Sulfato Duodecil de Sódio; kDa: kilo Daltons.

## 5. DISCUSSÃO

O método de extração de antígenos por SDS foi utilizado, pela primeira vez, no diagnóstico de neurocisticercose humana no presente trabalhos. Os extratos SDS obtidos, homólogo e heterólogo, apresentaram maior rendimento quantitativo nos ensaios desenvolvidos, pois obtiveram concentrações protéicas superiores aos extratos salinos correspondentes. Este método foi utilizado para extração de antígenos de *Toxoplasma gondii* (Nicolle, Manceaux, 1908) por BORGES (1996).

O teste ELISA têm sido amplamente utilizado no diagnóstico de várias doenças infecciosas incluindo neurocisticercose humana, conforme os Quadros I e II do item 1.2.4. da introdução deste trabalho. A sensibilidade é elevada, pois detecta nanogramas de anticorpos anti-metacestódeos de *T. solium* presentes nas amostras biológicas, principalmente LCR e soro. O teste é de execução simples, cujos reagentes são estáveis, portanto altamente reprodutível e a leitura pode ser visual quando se tem amostras biológicas de referência, reagente e não reagente, para determinada doença (DIWAN *et al.*, 1982). A especificidade do teste ELISA varia em função das endemias da área de estudo, DIAZ *et al.* (1992) demonstraram que a especificidade do ensaio imunoenzimático para o diagnóstico de neurocisticercose humana em amostras de soros de indivíduos de Bangladesh, área sócio-econômica deficiente e não endêmica para esta parasitose, é menor do que em amostras de soros de norte-americanos, que dispõem de infra-estruturas sanitárias e de fiscalização de carnes para consumo humano e também não endêmica para a parasitose analisada. Neste trabalho, as amostras de LCR, de pacientes com neurocisticercose, que não reagiram pelo teste ELISA eram provenientes de pacientes com calcificações intra-parenquimatosas ou na região parietal do SNC. E nenhuma amostra reagiu, do grupo controle negativo, portanto a especificidade foi elevada. No grupo de

pacientes com suspeita clínica de neurocisticercose três amostras apresentaram teste ELISA reagente: uma no extrato salino heterólogo e duas no SDS homólogo. Conforme os Quadros citados a maioria dos testes ELISA padronizados e aplicados no diagnóstico de neurocisticercose humana utilizaram extrato total de metacestódeos de *T. solium* como fonte de antígenos adsorvidos em microplacas. Em locais onde esquistossomose e hidatidose humanas não são endêmicas o teste ELISA utilizando extrato total de metacestódeos de *T. solium* apresenta menor índice de resultados falso-positivos (DIWAN *et al.*, 1982). O índice de reatividade cruzada é maior quando se utiliza amostras de soros. A reatividade positiva no soro de pacientes diagnosticada cisticercose, porém não comprova a localização no SNC, visto que a frequência relativa da localização do parasito permanece indefinida (ANDRIANTSIMAHAVANDY *et al.*, 1997). A utilização do espécime LCR aumenta a especificidade do ensaio, visto que a barreira hematoencefálica limita o acesso de anticorpos séricos ao SNC. Porém esta amostra só é colheitada em situações de patologias do SNC, pois é um procedimento delicado, que exige profissional médico treinado para não expor o paciente a riscos inerentes ao ato.

O teste de "Western Blotting" é de grande valor na análise de extratos totais, pois combina a fina resolução da eletroforese em gel de poliacrilamida com a alta sensibilidade de detectar pequenas quantidades de anticorpos do ensaio imunoenzimático (LARRALDE *et al.*, 1989).

Dentre as 15 bandas de pesos moleculares aparentes reconhecidas em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose, na presente dissertação, 11 são descritos na literatura: 8, 12-13, 18, 24, 26-28, 39-42, 45, 64-68, 88, 92-95 e 108-114 kDa. Foram imunodominantes, em ordem decrescente de frequência de reconhecimento, as bandas: 64-68 e 45 kDa; 108-114, 92-95, 83, 64-68 e 88 kDa; 64-68, 108-114, 77 e 86 kDa; 108-114, 88 e

92-95 kDa respectivamente nos extratos antigênicos: salino homólogo, salino heterólogo, SDS homólogo e SDS heterólogo.

A banda de 8 kDa foi descrita, juntamente com a de 26 kDa, por GOTTSTEIN, TSANG, SCHANTZ (1986) em amostras de LCR e soro; com sensibilidade e especificidade de 100% no teste "enzyme-linked immunoelectrotransfer blot" (EITB).

As bandas de pesos moleculares de 12-13, 18, 24 e 39-42 kDa correspondem a quatro das sete glicoproteínas, 50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13 kDa, purificadas por TSANG, BRAND, BOYER (1989). Estas glicoproteínas têm sido muito utilizadas no diagnóstico de cisticercose humana tanto em amostras de LCR quanto de soro; conforme os Quadros III e IV do item 1.2.4. deste trabalho. A sensibilidade do EITB com a utilização destas glicoproteínas é de 98% e a especificidade é de 100%, segundo a padronização e cujos índices têm sido reproduzidos nos trabalhos de aplicação. Na presente dissertação não se utilizou substâncias com afinidade por glicoproteínas, por exemplo: lectinas, fato que aumentaria a detecção de glicoproteínas antigênicas. A frequência de detecção da banda de 12-13 kDa foi de 32,5% no extrato salino homólogo. As bandas de 13 e 14 kDa são associadas a lesões vesiculares, ou seja, identificam a presença de metacestódeos viáveis no SNC; em regiões geográficas onde a esquistossomose não é endêmica (SIMAC *et al.*, 1995). A banda de 24 kDa somente foi reconhecida, pelas amostras de LCR testadas no extrato salino homólogo (25%). Esta glicoproteína foi purificada e analisada por PLANCARTE, FEXAS, FLISSER (1994), em amostras de LCR e soros de pacientes com neurocisticercose, através dos testes ELISA e Dot-ELISA e apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade.

A banda de 64-68 kDa foi purificada por imunoafinidade e analisada quanto a reatividade em amostras de LCR, através dos testes

ELISA, hemaglutinação passiva e Dot-ELISA. Por “Western Blotting” apresentou boa especificidade e imunodominância. A banda de 45 kDa também foi considerada específica na resposta imune de hospedeiros de metacestódeos de *T. solium* (KATTI, CHANDRAMUKHI, 1991). A banda de 60-75 kDa foi detectada em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose, porém não foi reconhecida em amostras de soros dos mesmos indivíduos (SIMAC *et al.*, 1995).

O marcador de peso molecular 92-95 kDa corresponde a uma proteína do antígeno B, caracterizado por GUERRA *et al.* (1982) e relacionado a baixa especificidade por apresentar reatividade cruzada com hidatidose (LARRALDE *et al.*, 1986) ou, pouca reatividade específica no diagnóstico de neurocisticercose humana (TSANG, BRAND, BOYER, 1989; KATTI, CHANDRAMUKHI, 1991).

Analizando a reatividade específica e cruzada de metacestódeos de *T. solium*, *E. granulosus* e *T. crassiceps* para o diagnóstico de cisticercose e hidatidose humanas em amostras de soros por “Western Blotting”, utilizando líquido de vesícula; LARRALDE *et al.* (1989) descreveram a banda de 108 kDa de metacestódeos de *T. solium* como específica para cisticercose. Nesta análise a banda de 88 kDa de extrato de *T. crassiceps* foi descrita como discriminativa para cisticercose. Em metacestódeos de *T. crassiceps* a banda de 113 kDa apresentou reatividade cruzada com hidatidose.

Analizando amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose VAZ *et al.* (1997) encontraram como peptídeos imunodominantes em “immunoblotting”: 98-92, 56-52 e 72-68 kDa; 72-68, 120, 155, 98-94, 76 e 115-108 kDa; 72, 62 e 42 kDa e 72-68 e 95-92kDa respectivamente nos extratos de metacestódeos: membrana de *T. solium*; líquido de vesícula de *T. solium*; membrana de *T. crassiceps* e líquido de vesícula de *T. crassiceps*.



Comprovando a heterogeneidade da resposta imune humoral dos hospedeiros humanos de metacestódeos de *T. solium*, pois produzem anticorpos específicos contra vários antígenos do parasito (CORREA *et al.*, 1985). Resultados semelhantes foram evidenciados nesta dissertação, visto que as amostras de LCR dos pacientes de neurocisticercose reconheceram 15 bandas antigênicas nos extratos utilizados. Outro aspecto evidenciado é a grande quantidade de peptídeos semelhantes entre as larvas das duas espécies parasitos que foram reconhecidos por anticorpos IgG presentes nas amostras de LCR. O perfil de reconhecimento de marcadores antigênicos pelas amostras de LCR não evidenciaram distinções marcantes de bandas espécie-específica ( $p > 0,05$ ), exceto para as bandas de 86 kDa e 24 kDa na espécie homóloga e as de 83 e 88 kDa na heteróloga, frente aos parasitos utilizados, resultados concordantes com VAZ *et al.* (1997).

A reatividade do espécime biológico utilizado nos testes ELISA e "Western Blotting" é influenciada pelo estágio do parasito: viável, em degeneração ou calcificado. Amostras de pacientes que possuem maior quantidade de metacestódeos viáveis no SNC têm maior probabilidade de apresentarem reatividade verdadeira-positiva pelo ELISA (BAILY *et al.*, 1988).

A neurocisticercose é uma doença de sintomatologia heterogênea e complexa. Pacientes com a forma benigna (que apresentam cisticercos no parênquima, calcificados e poucos ou nenhum sintoma) apresentam títulos baixos de anticorpos, detectáveis somente em amostras de soro. Em pacientes com a forma maligna (hidrocefalia, vasculite, infarto cerebral e outros sintomas neurológicos) o título de anticorpos é elevado principalmente em amostras de LCR (ZINI, FARRELL, WADEE, 1990). A presença de metacestódeos de *T. solium* na base do cérebro, cisternas ou ventrículos do SNC também influi na elevação do nível de anticorpos

específicos em amostras de LCR (ZINI, FARRELL, WADEE, 1990). No presente trabalho somente a amostra de um paciente, do grupo com neurocisticercose comprovada, não apresentou reatividade pelo "Western Blotting" frente a nenhum extrato antigênico utilizado; é possível que possuía um único cisto viável ou somente cistos calcificados, como demonstrado anteriormente são situações em que a sensibilidade do ensaio diminui.

Neste trabalho os métodos de extração antigênica, salino e SDS, podem ser comparados em relação as frequências imunodominantes dos peptídeos reconhecidos em amostras de LCR. Observou-se que na espécie homóloga a banda de 45 kDa somente foi reconhecida no extrato salino, demonstrando que a ação de desnaturação do SDS impossibilitou o reconhecimento do epítipo antigênico. Nesta mesma espécie a banda de 64-68 kDa não sofreu alteração no seu reconhecimento, visto que foi imunodominante nas duas preparações. A banda de 108-114, 77 e 86 kDa apresentaram maior índice de reconhecimento no extrato SDS. Portanto, a ação do SDS melhorou a exposição do epítipo destes peptídeos.

Na espécie heteróloga as bandas de 83 e 88 kDa foram exclusivamente reconhecidas. Sendo que a banda de 83 kDa foi imunodominante no extrato salino e a de 88 kDa em ambos os extratos, porém com 40% a mais de reconhecimento no extrato SDS. As bandas de 108-114, e 92-95 kDa também tiveram maior reconhecimento no extrato SDS. A banda de 64-68 kDa foi imunodominante no extrato salino (50%) e no extrato SDS foi reconhecida somente em 7,5% das amostras. Portanto o processo de desnaturação por SDS elevou o reconhecimento de vários peptídeos imunodominantes.



## 6. CONCLUSÕES

- Os peptídeos: 64-68 e 45 kDa foram imunodominantes, em ordem decrescente de frequência de reconhecimento, no extrato salino homólogo;

- O teste ELISA utilizando extrato salino heterólogo apresentou sensibilidade e especificidade similares aos índices obtidos com o extrato de referência. Pelo "Western Blotting" os peptídeos: 108-114, 92-95, 64-68 e 88 kDa foram imunodominantes;

- Os extratos SDS, homólogo e heterólogo, apresentaram rendimentos protéicos superiores aos correspondentes extratos salinos. Através do teste ELISA apresentaram sensibilidade e especificidade similares ao extrato de referência. Os peptídeos: 64-68, 108-114, 77 e 86 kDa foram imunodominantes no extrato SDS homólogo e os de 108-114, 88 e 92-95 kDa no extrato SDS heterólogo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- AGAPEJEV, S. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.38, n.3, p.207-216, 1996.
- AGGARWAL, S. K. Diagnosis and management of neurocysticercosis. **Hospital Practice**, New York NY, v.15, p.106-120, 1993.
- ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., LESBORDES, J. L., RASOAHARIMALALA, B., PEGHINI, M., RABARIJAOWA, L., ROUX, J., BOISIER, P. Neurocysticercosis late-onset epilepsy in Madagascar. **Tropical Medicine and International Health**, v.2, n.8, p.741-746, 1997.
- ARAMBULO III, P. V., WALLS, K. W., BULLOCK, S., KAGAN, I. G. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). **Acta Tropica**, Amsterdam, v.35, p.63-67, 1978.
- BAILY, G. G., MASON, P. R., TRIJSSEAR, F. E. J., LYONS, N. F. Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA tests using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.82, p.295-299, 1988.

\* Segundo Normas ABNT  
NBR 6023/89

- BASSI, G. E., ISHIKI, D. K., FERREIRA, A. W., CAMARGO, M. E. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano - considerações sobre o limiar de reatividade. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, São Paulo, v.27, n.2, p.49-52, 1991.
- BIONDI, G. F., MUCCIOLO, R. G., NUNES, C. M., RICHTZENHAIN, L.J. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.64, n.4, p.261-266, 1996.
- BORGES, F. A. C. Pesquisa do antígeno SAG 1 (P30) de *Toxoplasma gondii* simultaneamente à detecção de anticorpos e imune-complexos em amostras de líquido cefalorraquiano, reagentes e não reagentes para anticorpos anti-HIV. **Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia**, 173p., 1996.
- BRAND, J. A., TSANG, V. C. W. A rapid immunoblot assay (western blot) to detect specific antibodies for human immunodeficiency virus, *Schistosoma mansoni* and *Taenia solium* (cysticercosis). **Jornal of Immunoassay**, New York NY, v.10, n.2/3, p.237-255, 1989.
- CAMARGO-LIMA, J. G. Cisticercose encefálica: aspectos clínicos. **Tese Livre Docência**, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1966.
- CHAVES-BORGES, F. A., MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratório**. Uberlândia, EDUFU, 1997, 55p.

- COKER-VANN, M., BROWN, P., GAJDUSEK, D. C. Serodiagnosis of human cysticercosis using a chromatofocused antigenic preparation of *Taenia solium* cysticerci in an enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.78, p.492-496, 1984.
- CORREA, D., DALMA, D., ESPINOZA, B., PLANCARTE, A. RABIELA, M.T., MADRAZO, E., GORODEZKY, C. FLISSER, A. Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. **Journal of Parasitology**, Lawrence KS, v.71, p.535-541, 1985.
- COSTA, J. M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.44, n.1, p.15-31, 1986.
- COSTA, J. M., FERREIRA, A. W., MAKINO, M. M., CAMARGO, M. E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.24, n.6, p.337-341, 1982.
- COSTA, J. M., MINEO, J. R., LIVRAMENTO, J. A., CAMARGO, M. E. Detecção pelo teste imunoenzimático ELISA de anticorpos IgM anti-*Cysticercus cellulosae* no líquido cefalorraqueano na neurocisticercose. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.43, n.1, p.22-28, 1985.
- COSTA-CRUZ, J. M. Diagnóstico imunológico da cisticercose. **Anais XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia**, p.105-106, 1995, (Resumo).

COSTA-CRUZ, J. M., ROCHA, A., SILVA, A. M., MORAIS, A. T., GUIMARÃES, A. H. B., SALOMÃO, E. C., ALCÂNTARA, T. M. Ocorrência de cisticercose em necrópsias realizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.53, n.2, p.227-232, 1995.

CRUZ, M. E., CRUZ, I., PREUX, P. M., SCHANTZ, P. M., DUMAS, M. Headache and cysticercosis in Ecuador, South America. **Headache**, v.35, p.93-97, 1995.

DEL BRUTTO, O H., SOTELO, J. Neurocysticercosis: An update. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago IL, v.10, n.6, p.1075-1087, 1988.

DEL BRUTTO, O H., WADIA, N. H., DUMAS, M., CRUZ, M., TSANG, V. C. W., SCHANTZ, P. M. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v.142, p.1-6, 1996.

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 in Peru. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.46, n.5, p.610-615, 1992.

DIWAN, A. R., COKER-VANN, M., BROWN, P., SUBIANTO, D. B., YOLKEN, R., DESOWITZ, R., ESCOBAR, A., GIBBS, C. J., GAJDUSEK, D. C. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci ou *Taenia solium*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.31, n.2, p.364-369, 1982.

ESPINOZA, B., RUIZ-PALACIOS, G., TOVAR, A., SANDOVAL, M. A., PLANCARTE, A., FLISSER, A. Characterization of enzyme-linked immunosorbent assay of the immune response in patients with neurocysticercosis and application in immunodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.24, n.4, p.536-541, 1986.

ESTANÖL, B., CORONA, T., ABAD, P. A. Prognostic classification of cerebral cysticercosis: therapeutic implications. **Journal of Neurology and Psychiatry**, v.49, p.1131-1134, 1986.

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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.84, p.559-562, 1990.

FERNANDES-GOMEZ, R., CUESTA-BANDERA, C., MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R. Respuesta serológica en cisticercosis experimental por *Cysticercus longicollis* (*Taenia crassiceps*) **Rev. Ibér. Parasitol.**, v.46, n.3, p.297-303, 1986.

- FERREIRA, A. P., VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., SASAKI, A. T.,  
FERREIRA, W., LIVRAMENTO, J. A. Hemagglutination test for the  
diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent  
using homologous and heterologous antigens. **Revista do Instituto de  
Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.39, n.1, p. 29-33, 1997.
- FLISSER, A., ESPINOZA, B., TOVAR, A., PLANCARTE, A., CORREA, D.  
Host-parasite relationship in cysticercosis, immunologic study in different  
compartments of the host. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.20,  
p.95-102, 1986.
- FORLENZA, O. V., VIEIRA FRANCISCO, A. H. G., MACHADO, L. R.,  
NÓBREGA, J. P. S., BARROS, N. G. Transtornos depressivos  
associados lá neurocisticercose. Prevalência e correlações clínicas.  
**Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.56, p.45-52, 1988
- FREEMAN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800;  
Rudolphi, 1810) (Cestoda). **Canadian Journal of Zoology**, v.40, p.969-  
990. 1962.
- FRIEDMAN, R. D. Comparison of four different silver-staining techniques for  
salivary protein detection in alkaline polyacrilamye gels. **Annals of  
Biochemistry**, v.126, p.346-349, 1982.
- FRITZSCHE, M., GOTTSTEIN, B., WIGGLESWORTH, M.C., ECKERT, J.  
Serological survey of human cysticercosis in irianese refugee camps in  
Papua New Guinea. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.47, p.69-77, 1990.

GARCIA, E., SOTELO, J. A new complement fixation test for the diagnosis of neurocysticercosis in cerebrospinal fluid. **Journal of Neurology**, Berlin, v.238, p.379-382, 1991.

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

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. **The Lancet**, v.338, p.549-551, 1991

GARCIA, H. H., HERRERA, G., GILMAN, R. H., TSANG, V. C. W., PILCHER, J. B., DIAZ, J. F., CANDY, E. J., MIRANDA, E., NARANJO, J. and The cysticercosis Working group in Peru. Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.50, n.2, p.152-157, 1994.



GARCIA, H. H., GILMAN, R. H., TOVAR, M. A., FLORES, E., JO, R., TSANG, V. C. W., DIAZ, F., TORRES, P., MIRANDA, E. and the cysticercosis working group in Peru. Factors associated with *Taenia solium* cysticercosis: analysis of nine hundred forty-six peruvian neurologic patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.52, n.2, p.145-148, 1995.

GARCIA, H. H., GILMAN, R. H., CATACTORA, M., VERASTEGUI, M., GONZALEZ, A. E., TSANG, V. C. W. and the Cysticercosis Working Group in Peru. Serologic evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago IL, v.175, p.486-489, 1997.

GRACIA, F., CHAVARRIA, R., ARCHBOLD, C., LARREATEGUI, ttM., CASTILLO, L., SCHANTZ, P. M., REEVES, W. C. Neurocysticercosis in Panama: preliminary epidemiologic study in the azuero region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.42, n.1, p.67-69, 1990.

GONZALEZ, C. I., RAMIREZ, G., RODRIGUEZ, M. ELISA en el diagnóstico de cisticercosis. **Revista UIS-Medicina**, Bucaramanga, v.13, n.2, p.7-14, 1985.

GOTTSTEIN, B., TSANG, V. C. W., SCHANTZ, P. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.35, n.2, p.308-313, 1986.

- GOTTSTEIN, B., ZINI, D., SCHANTZ, P. M. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v.38, p.299-303, 1987.
- GUERRA, G., FLISSER, A., CANEDO, L., LACLETTE, J. P. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In FLISSER, A., WILLMS, K., LACLETTE, J. P., LARRALDE, C. **Cysticercosis present state of knowledge and perspectives**. Academic Press. N. Y., p.437, 1982, 700p.
- KATTI, M. K., CHANDRAMUKHI, A. Comparative evaluation of cysticercal antigens and immunoassays in the diagnosis of neurocysticercosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v.85, n.6, p.605-615, 1991.
- KLINKER, H., TINTELNOT, K., JOERES, R., MULLER, J., GROSS, V., SCHMIDT-ROTTE, H., LANDWEHR, P., RICHTER, E. *Taenia crassiceps* infection in AIDS. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, Stuttgart, v.117, n.4, p.133-138, 1992.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.15, p.680-685, 1970.
- LARRALDE, C. Immunodiagnostico de la cisticercosis: del laboratorio a la industria. In: FLISSER, A.; MALAGÓN, F. **Cisticercosis humana y porcina: su conocimiento e investigación en México**, Limusa, 1989, 267p.

LARRALDE, C., LACLETTE, J. P., OWEN, C. S., MADRAZO, I., SANDOVAL, M., BOJALK, R., SCIUTTO, E., CONTRERAS, L., ARZATE, J., DIAZ, M. L., GOVEZENSKY, T., MONTOYA, R. M., GOODSID, F. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.35, n.5, p.965-973, 1986.

LARRALDE, C., MONTOYA, R. M., SCIUTTO, E., DIAZ, M. L., GOVEZENSKY, T., COLTORTI, E. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*T. solium*, *E. granulosus*, and *T. crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.40, n.3, p.282-290, 1989.

LARRALDE, C., SOTELO, J., MONTOYA, R. M., PALENCIA, G., PADILLA, A., GOVEZENSKY, T., DIAZ, M. L., SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago IL, v.114, p.926-928, 1990.

LEES, M. B., PAXMAN, S. Modification of the Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein. **Analytical Biochemistry**, New York NY, v. 47, p. 184-192. 1972.

LOWRY, V. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

- MACHADO, A. J. , CAMARGO, M. E., HOSHINO, S. Reação de imunofluorescência para a cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas à lâminas de microscopia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.7, n.3, p.181-183, 1973.
- MALAGÓN, F. Elementos del binomio taeniasis/cisticercosis una síntesis. In FLISSER, A., MALAGÓN, F. **Cisticercosis humana y porcina: su conocimiento e investigación en México**, Limusa, p. 3-6, 1989, 267p
- MALLA, N., KAUR, M., KAUR, U., GANGULY, N. K., MAHAJAN, R. C. Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of anticysticercus antibodies in cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, v.36, n.2, p.181-190, 1992.
- MARTIRANI, I., HOXTER, G., WAJCHENBERG, B. L., MARIANI, I., CINTRA, A. B. U. Determination of polysaccharide hexoses and hexosamines in normal human sera. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, St. Louis MO, v.54, p.773, 1959.
- MCMANUS, D. P. Molecular technology: improving strategies for controlling hydatid disease and cysticercosis. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, v.21, n.2, p.161-173, 1990.
- MELO, C. S. de, VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., SILVA, M. V. da, MACHADO, A. de B. B. Human neurocysticercosis IgE in cerebrospinal fluid. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.55, n.1, p.8-11, 1997.

MICHAULT, A., COUBES, P., LAPORTE, J. P., BOUILLAN-LINET, E., LEROY, D. Diagnostic de la cysticercose encéphalique a l'île de la réunion par méthode immuno-enzymologique (ELISA): comparaison avec la tomodensitométrie. **Pathologie Biologie**, Paris, v.36, n.3, p.266-270, 1988.

MICHAULT, A., RIVIÈRE, B., FRESSY, P., LAPORTE, J. P., BERTIL, G., MIGNARD, C. Apport de l'enzyme-linked immunoelectrotrasfer blot assay au diagnostic de la neurocysticercose humaine. **Oath Biologie**, v.38, n.2, p.119-125, 1990.

MOHAMMAD, I. N., HEINER, D. C., MILLER, B. L., GOLDBERG, M. A., KAGAN, I. G. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.20, n.4, p.775-779, 1984.

MONDRAGÓN, A., PLANCARTE, A., FLISSER, A. El diagnóstico de la cisticercosis humana por ELISA. **Salud Pública de México**, v.36, n.4, p.393-398, 1994

MORO, P.L., GUEVARA, A., VERASTEGUI, M., GILMAN, R. H., POMA, H., TAPIA, B., TSANG, V. C. W., GARCIA, H. H., PACHECO, R., LAPEL, C., MIRANDA, E., and The Cysticercosis Working Group in Peru. Distribution of hydatidosis and cysticercosis in different peruvian populations as demonstrated by enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.51, n.6, p.851-855, 1994.

- MOSES, A. Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cisticercoses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.3, p.320, 1911.
- NASCIMENTO, E., NOGUEIRA, P. M. P., TAVARES, C. A. P. Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. **Parasitology Research**, v.73, p.446-450, 1987.
- PAMMENTER, M. D., ROSSOUW, E. J. Serological techniques for the diagnosis of cysticercosis. **SA Medical Journal**, v. 65, p. 875-878, 1984.
- PETERSON, G. L. Review of the folin phenol quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, New York NY, v.100, p.201-220, 1979.
- PIALARISSI, C. S. de M., NITRINI, S. M. O. de O. Utilização do teste de eritroimunoadsorção por captura no imunodiagnóstico da neurocisticercose. **Revista de Saúde Pública**, v.28, n.2, p.116-120, 1994.
- PIALARISSI, C. S. de M., NITRINI, S. M. O. de O. Comparação entre os testes de eritroimunoadsorção por captura, imunoenzimático e hemaglutinação passiva utilizados no diagnóstico da neurocisticercose. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.2, p.115-119, 1995.
- PLANCARTE, A., ESPINOZA, B., FLISSER, A. Imunodiagnostico de la cisticercosis humana por el ensayo inmunoenzimatico (ELISA). In: FLISSER, A., MALAGÓN, F. **Cisticercosis humana y porcina: su conocimiento e investigación en México.**, Limusa, p.159-163, 1989, 267p.

PLANCARTE, A., FEXAS, M., FLISSER, A. Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP 24, na immunodominant antigen of *Taenia solium* for the diagnosis of human neurocysticercosis. **International Journal for Parasitology**, Oxford. v.24, n.5, p.733-738, 1994.

RETAMAL, C. G., ZULANTAY, I. A , SARIEGO, H. R., Apt B, R. M. M. W. Evaluación de ELISA y contrainmunoelctroforesis en el diagnóstico de la neurocisticercosis humana en Chile. **Revista Médica Chile**, Santiago, v.123, p.1461-1466, 1995.

REY, L. Principais grupos de protozoários e metazoários em que há parasitas do homem ou seus vetores. In **Bases da parasitologia médica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.13-22, 1992, 349p.

RICHARDS, F., SCHANTZ, P. M. Laboratory diagnosis of cysticercosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia PA, v.11, n.4, p.1011-1028, 1991.

SARTI, E., SCHANTZ, P. M., PLANCARTE, A., WILSON, M., GUTIERREZ, I. O., LOPEZ, A. S., ROBERTS, J., FLISSER, A. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.46, n.6, p.677-685, 1992.

SARTI, E., SCHANTZ, P. M., PLANCARTE, A., WILSON, M., GUTIERREZ, I. O., AGUILLERA, J., ROBERTS, J., FLISSER, A. Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.88, p.49-52, 1994.

SARTI-GUTIERREZ, E. J., SCHANTZ, P. M., LARA-AGUILERA, R., DANDOY, H. G., FLISSER, A. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v.39, p.194-198, 1988.

SIMAC, C., MICHEL, P., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., ESTERRE, P., MICHAULT, A. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis. **Parasitology Research**, Berlin, v.81, p.132-136, 1995.

SILVA-VERGARA, M. L., VIEIRA, C. de O., CASTRO, J. H., MICHELETTI, L. G., OTANO, A. S., FRANQUINI Jr, J., CABRAL, M., LEBOREIRO, A., MARQUES, J. O., SOUZA, W. F. de, COSTA-CRUZ, J. M., PRATA, A. Achados neurológicos e laboratoriais em população de área endêmica para teníase-cisticercose, Lagamar, MG, Brasil (1992-1993). **Revistado Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.36, n.4, p.335-342, 1994.



- SCHANTZ, P. M., SARTI, E. Diagnostic methods and epidemiological surveillance of *Taenia solium* infection. **Acta Leidensia**, v.57, p.155-163, 1989.
- SCHANTZ, P. M., CRUZ, M., SARTI, E., PAWLOWSKY, Z. S. La erradicabilidad potencial de la teniasis y la cisticercosis. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, Washington DC, v.116, n.5, p.465-466, 1994.
- SCHANTZ, P. M., SARTI, E., PLANCARTE, A., WILSON, M., GRIALES, J. L., ROBERTS, J., FLISSER, A. Community - based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological, screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago IL, v.18, p.879-885, 1994.
- SHORT, J. A., HEINER, D. C., HSIAO, R. L., ANDERSEN, F. L. Immunoglobulin E and G4 antibodies in cysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.28, n.7, p.1635-1639, 1990.
- SPINA-FRANÇA, A., KLEINE, T. O. Clinical validity of IgG, IgA and agarose gel electrophoresis of proteins in CSF in diagnosing neurocysticercosis. **Advances in Pathology**, Oxford and New York, v.1, p.519-521, 1982.
- SPINA-FRANÇA, A., LIVRAMENTO, J.A., MACHADO, L. R. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid: immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.51, n.1, p.16-20, 1993.

TAVARES JR, A. R. Psychiatric disorders in neurocysticercosis (letter). **Br. J. Psychiatry**, p.163-839, 1993.

TAVARES JR, A. R. Aspectos neuropsiquiátricos da cisticercose humana. **Tese de Doutorado**, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, 1994.

TÉLLEZ GIRÓN, E., RAMOS, M. C., DUFOUR, L., MONTANTE, M. Aplicacion del metodo ELISA para el diagnostico de la cisticercosis. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, Washington DC, v.97, n.1, p.8-12, 1984.

TOLEDO, A., CRUZ, C., FRAGOSO, J. P., LACLETTE, J. P., MERCHANT, M.T., HERNÁNDEZ, M., SCIUTTO, E. In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. **The Journal of Parasitology**, v.83, n.2, p.189-193, 1997.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v.76, p.4350-4354, 1979.

TSANG, V. C. W., BRAND, J. A., BOYER, A. E. An enzyme-linked immuno electrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*) **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago IL, v.159, n.1, p.50-59, 1989.

- VAZ, A. J., FERREIRA, A. W. Imunodiagnóstico da neurocisticercose: teste imunoenzimático com antígenos quimicamente ligados a suportes para pesquisa de anticorpos em soro e líquido cefalorraquiano. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.30, n.1, p.1-10, 1988.
- VAZ, A. J., FERREIRA, A. W., SILVA, M. V. da, CAMARGO, E. D., BATISTA, L., SOUZA, A. M. C. Teste imunoenzimático para pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em líquidos cefalorraquianos de pacientes com meningites de etiologia indeterminada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.32, n.3, p.196-203, 1990.
- VAZ, A. J., FERREIRA, A. W., NUNES, C. M., PIAZZA, R. M. F., NAKAMURA, P. M. *Cysticercus longicollis* and *Cysticercus cellulosae*: antigenic and immunogenic characterization. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, p.318, 1994, (Suplemento I).
- VAZ, A. J., NAKAMURA, P. M., CAMARGO, M. E., CAMARGO, E. D., FERREIRA, A. W. Dot-ELISA for the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in cerebrospinal fluid using a new solid phase (resin-treated polyester fabric) and *Cysticercus longicollis* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.38, n.6, p.391-396, 1996.

- VAZ, A. J., FERREIRA, A. W., NUNES, C. M., PIAZZA, R. M. F., LIVRAMENTO, J. A., DA SILVA, M. V., NAKAMURA, P. M., FERREIRA, A. W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence KS, v.57, n.3, p.354-357, 1997.
- VENKATESAN, P., WAKELIN, D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. **Parasitology Today**, Cambridge, v.9, n.6, p.228-238, 1993.
- VIANNA, L. G., MACEDO, V., COSTA, J. M., MELLO, P., SOUZA, D. Estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em Brasília, Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.19, n.3, p.149-156, 1986.
- VIANNA, L. G., COSTA-CRUZ, J. M., MACEDO, V., SOUZA, D. de, MOREIRA, D. G. Estudo comparativo dos testes imunoenzimáticos ELISA-G e ELISA-M, Imunofluorescência indireta e fixação do complemento no diagnóstico da cisticercose humana. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.50, n.3, p.302-308, 1992.
- WEBBE, G. Human cysticercosis: parasitology, pathology, clinical manifestations and available treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.64, p.175-200, 1994.
- WEINBERG, M. Recherche des anticorps spécifiques dans la distomatose et la cisticercose. **C.R. Soc. Ed. (Paris)** v.66, p.219, 1909.

- WILSON, M., TSANG, V. C. W. *Taenia solium* cysticercosis: an under-recognized but serious Public Health Problem. **Parasitology Today**, Cambridge, v.11, n.3, p.124-126, 1995.
- WILSON, M., BRYAN, R. T., FRIED, J. A., WARE, D. A., SCHANTZ, P. M., PILCHER, J. B., TSANG, V. C. W. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago IL, v.164, n.5, p.1007-1009, 1991.
- WILSON, M. B., NAKANE, P. K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In KNAPP, K.; HOLUBAR; WICH, G. (eds.): **Immunofluorescence and Related Techniques** North-Holland Biomedical, Amsterdam, 1978, 215p.
- ZENTENO-ALANIS, G. H. Classification of human cysticercosis. In FLISSER, A., WILLMS, K., LACLETTE, J. P., LARRALDE, C.. **Cysticercosis present state of knowledge and perspectives**. Academic Press. N. Y., p.107-126, 1982, 700p.
- ZHI-BIAO, X., DAN, L. Significance of western blot in diagnosis of cysticercosis cellulosae. **Chinese Medical Journal**, v.105, n.12, p.1004-1008, 1992.
- ZINI, D., FARRELL, V. J. R., WADEE, A. A. The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.53, p.656-661, 1990.