

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTIGÊNICA NA PESQUISA DE ANTICORPOS
ANTICISTICERCOS DE *TAENIA SOLIUM***

**EVALUATION OF ANTIGENIC ANSWER IN THE RESEARCH OF ANTIBODY
ANTI-CISTYRCERCUS OF *TAENIA SOLIUM***

Lago, EMO*, Vaz, AJ**

RESUMO: O diagnóstico sorológico da cisticercose vem se destacando como uma fonte alternativa seguramente eficaz ao estudo da doença. Com a proposta de acessibilidade, devido primordialmente à relação custo, os testes ELISA são promissores à pesquisa sorológica de campo. Nesse contexto, o presente trabalho estabeleceu a validação de um teste ELISA com alto valor preditivo positivo (VPP) para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *Taenia solium* em inquéritos sorológicos na população geral. Os antígenos ensaiados foram líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) e total de cisticercos de *T. solium* (T-Tso), respectivamente estes constituíram os testes ELISA-Tcra e ELISA-Tso. Foram ensaiadas 610 amostras de soro de indivíduos supostamente saudáveis e 20 amostras de soro de indivíduos com neurocisticercose confirmados por critérios clínicos e laboratoriais. Após os ensaios, o teste ELISA-Tcra apresentou especificidade de 96,2% e o VPP variou entre 2 a 58% para prevalências de 0,1 a 5,0%; quanto à sensibilidade e VPP houve similaridade entre os resultados. O ELISA-Tso apresentou resultados menos expressivos, a especificidade foi calculada em 94,8% e o VPP variou entre 1,8 a 50% para as prevalências de 0,1 a 5,0%; essa redução na especificidade se dá pelo aumento do número de resultados falso-positivos no teste em consequência da expressão de proteínas de alto peso molecular. Através dos parâmetros avaliados fica notório o desempenho promissor do teste ELISA-Tcra como sendo arbitrário no estudo de inquéritos sorológicos da população geral.

PALAVRAS-CHAVE: Cisticercose. Diagnóstico. Validação. Parâmetros.

ABSTRACT: *The serum diagnosis of cysticercoids has been pointed out as an efficient alternative source in the study of the disease. With the proposal of being accessible, primarily as regards cost, the ELISA tests are promising in serological field research. In this context, the present study established the validation of an ELISA test with a high positive predictive value (PPV) for researching the anti-cysticerci of Taenia solium antibodies in a serological survey in the general population. The antigens tested were the vesicular liquid of T. crassiceps (LV-Tcra) and the total of T. solium (T-Tso), which constituted the ELISA-Tcra and ELISA-Tso tests respectively. Tests were performed in 610 samples of serum from supposedly healthy individuals, and 20 samples from individuals with neurocysticercosis confirmed by clinical and laboratorial criteria. The ELISA-Tcra specificity was 96.2% and the VPP ranged from 2 to 58% for prevalences from 0.1 to 5.0%. As regards sensitivity and VPP, there were similarities in the results. The ELISA-Tso showed less significant results: the specificity was calculated at 94.8% and the VPP ranging between 1.8 and 50% for prevalences from 0.1 to 5.0%. This reduction in specificity is due to the increase in the number of false-positive results in the test, because of the expression of proteins with a high molecular weight. Through these parameters the promising development of the ELISA-Tcra test is clear as being mandatory in the studies of serological surveys in the general population.*

KEYWORDS: Cysticercosis. Diagnosis. Validation. Parameters.

* Elói Marcos de Oliveira Lago – Mestre em Imunologia Clínica pela Universidade de São Paulo, Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas pela Universidade Guarulhos.

** Adelaide José Vaz – Professora Livre-Docente em Imunologia Clínica pela Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO

A cisticercose humana é causada pela presença da forma larvária da *Taenia solium* em tecidos após a ingestão de ovos viáveis. A localização do parasita no sistema nervoso central (SNC), neurocisticercose (NC), é a forma mais estudada, pela gravidade dos sintomas e pelas elevadas letalidade e morbidade. Entretanto, a forma larvária ainda tem tendência a se instalar no globo ocular, conjuntivo interfascicular do músculo estriado, tela subcutânea e leptomeninges. A incidência da NC é variável e relacionada principalmente a fatores socioeconômicos e culturais, constituindo importante problema de saúde pública em regiões de condições sanitárias deficientes, assim como em países desenvolvidos que recebem imigrantes de regiões onde a infecção é endêmica.

O homem é o hospedeiro definitivo do verme adulto, e elimina ovos embrionados pelas fezes, que são infectantes no meio ambiente. O suíno, após ingestão dos ovos, pode desenvolver cisticercose, a forma larvária do parasita. O homem, ingerindo a carne suína com parasitas viáveis, desenvolve o verme adulto (teníase). Devido aos maus hábitos de higiene e às condições sanitárias deficientes, o homem também pode adquirir cisticercose após ingerir acidentalmente água e alimentos contaminados com ovos embrionados ou, ainda, por auto-infecção, quando portador do verme adulto.

Quando a forma larvária se localiza no SNC, pode desenvolver manifestações clínicas de diferentes formas, que dependerão de um conjunto de fatores, incluindo resposta imune do hospedeiro, topografia da lesão, localização das larvas, quantidade de cistos e tipos de seqüelas desenvolvidas no homem¹. Esse pleomorfismo da doença torna difícil o diagnóstico clínico e a utilização de terapia adequada.

Aspectos epidemiológicos

Estima-se que a NC cause anualmente a morte de 50 mil pessoas e que 50 milhões são portadoras de cisticercose no mundo². De acordo com a Organização Mundial de Saúde, foi proposto que a NC deva ser declarada uma doença mundial. Novos casos de NC vêm sendo relatados por clínicos e em hospitais. Acredita-se que a notificação compulsória seja a melhor forma de quantificar a incidência e a prevalência da NC, e que permitirá o emprego de recursos para a sua erradicação.

A NC é considerada uma doença endêmica em regiões carentes da América Latina, Ásia, África, China, Indonésia e preocupa autoridades em países em desenvolvimento^{3,4}, provocando elevado número de casos de epilepsia. A migração e o turismo têm contribuído para o surgimento de casos de NC na Austrália, Europa e América do Norte. Levantamentos epidemiológicos demonstraram que a NC é uma doença

emergente em países desenvolvidos como os Estados Unidos^{5,6,7}. Em recente estudo, foi demonstrado que em 11 Estados americanos com população hispânica, como na Califórnia e no Texas, a NC foi responsável pelo aumento de 10% de casos de epilepsia indefinidos encontrados no hospital de emergência⁸.

No Brasil, são áreas endêmicas os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo e Distrito Federal, e áreas com casos ocasionais os estados de Pernambuco, Bahia, Maranhão, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte⁹.

A análise de dados publicados no Brasil entre 1915 e 1995 mostrou índices de prevalência de NC em autópsias de 0,12% em São Paulo a 9% em Minas Gerais. Nos Serviços de Neurologia e Neurocirurgia em São Paulo, a frequência observada foi de 0,031 a 7,5%, enquanto que na Região Nordeste foi de 0,03 a 0,06%. Em estudos soroepidemiológicos, a incidência de cisticercose foi de 0,68 a 5,2%⁹. A partir de estudo soroepidemiológico realizado em Brasília, foi encontrada a frequência de anticorpos anti-cisticercose em 5,2% de 1.122 indivíduos estudados¹⁰.

Aspectos clínicos e patológicos

O período compreendido entre a infecção inicial e o aparecimento dos sintomas na NC é variável, podendo ser de alguns meses a vários anos. O aspecto clínico da NC é polimórfico; a enfermidade pode variar desde a forma assintomática até a incapacidade e mesmo a morte.

As manifestações clínicas da NC são inespecíficas. Dependem de vários fatores, como número, tamanho, localização, estado evolutivo do parasita, bem como do grau de reação imunológica do hospedeiro ao parasita¹¹. Na cisticercose humana, o número de parasitas encontrado costuma ser pequeno. Em cerca de 77% dos casos de cisticercose humana são encontrados até cinco parasitas¹². A gravidade da doença pode ser mensurada pelo coeficiente de letalidade da NC, estimado entre 5 e 25%¹³.

Os cisticercos apresentam um processo natural de evolução que culmina com sua morte e degeneração. As manifestações clínicas da NC são dependentes dos diferentes estágios evolutivos dos cistos, interagindo com a resposta imune do hospedeiro¹¹.

De acordo com Spina-França¹⁴, a NC exibe um modelo patogênico de infecção no qual prevalecem os fenômenos peculiares ao SNC. Esse modelo patogênico local, do tipo repetitivo, caracteriza-se por apresentar evolução crônica, com surtos de agudização sem periodicidade definida, que ocorrem quando os cisticercos entram em processo de degeneração, liberando antígenos parasitários e exacerbando a síndrome do líquido cefalorraquidiano (LCR) na NC, caracterizada por eosinofilia, proteinorraquia, determinando muitas vezes o início da sintomatologia, ou exacerbando a existente^{14,15}.

Diagnóstico

O diagnóstico da NC baseia-se em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico clínico da NC é dificultado em razão da sintomatologia polimorfa e inespecífica, podendo ser confundida com outras patologias que acometem o SNC. Apesar dessa diversidade, existem sinais e alterações de exames complementares que são mais frequentes na NC do que em outras doenças do SNC. Dados epidemiológicos como a endemicidade da área de procedência do paciente também auxiliam no direcionamento diagnóstico¹⁶.

É consenso geral que o diagnóstico preciso é alcançado em instituições especializadas através do uso simultâneo de estudos de imagem e análise laboratorial do LCR, que inclui exames citomorfológico e bioquímico e testes imunológicos¹¹.

No diagnóstico por imagem, a radiografia simples (raio X) mostra apenas cistos calcificados¹¹, outros exames de imagem permitem a visualização de parasitas nas formas císticas e calcificadas, na tomografia computadorizada (TC)¹⁷ e cistos viáveis, no início da degeneração, hialinização e fibrose, na ressonância magnética nuclear (RMN)¹⁸.

No diagnóstico imunológico, as dificuldades são relacionadas a fatores pertinentes ao parasita (localização em sítio imunológico privilegiado, número de cisticercos presentes, fase evolutiva dos mesmos, liberação de antígenos comuns a outros parasitas); a fatores inerentes ao hospedeiro que determinam respostas individuais e variadas de combate ao parasita; à heterogeneidade das reações imunológicas empregadas (tipo de antígeno, diluição das amostras, reagentes, grau de sensibilidade e especificidade, etc.)¹⁹. Ainda assim, a pesquisa de anticorpos anticisticercos de *T. solium* no LCR constitui um importante elemento de auxílio diagnóstico. A interpretação dos resultados dos testes diagnósticos deve ser feita conjuntamente com os dados clínicos e com o resultado dos exames de neuroimagem, quando possível, pois poderão ocorrer resultados falso-negativos. As justificativas para essas ocorrências são, entre outras, estágios evolutivos da doença, variação antigênica do parasita, efeitos imunossupressores da corticoterapia e baixa sensibilidade de alguns testes²⁰.

Biagi & Piña²¹ descreveram pela primeira vez a reação de imunofluorescência indireta, usando como antígeno cortes histológicos do cisticerco da *T. solium*. Esses, quando colocados em presença de soros de suíno infectados revelaram um padrão de fluorescência mais intenso nos corpúsculos calcáreos, menos intenso na membrana e escólex e nenhuma fluorescência na cutícula.

Arambulo et al.²² introduziram o teste ELISA para o diagnóstico da NC no soro, utilizando antígeno deslipidizado das formas adulta e larvária da *T. solium*.

Os resultados obtidos com o emprego do ELISA no soro são relatados como razoáveis, em torno de 80% de sensibilidade e especificidade de 70 a 95%^{23,24,25,26}. Bue-

no et al²⁷ relataram sensibilidade de 94,1% com amostras de LCR e 70,6% com amostras de soro no teste ELISA com antígeno salino total de *T. solium*, sendo especificidade de 100% para LCR e 80% para soro.

A forma larvária da *Taenia crassiceps*, cepa ORF²⁸ tem sido empregada como fonte alternativa de antígeno em diferentes testes imunodiagnósticos da NC. A reatividade cruzada observada com antígenos da forma larvária de *T. solium* indica que os parasitas apresentam epítomos antigênicos comuns e importantes, presentes em concentrações suficientes para o uso em testes imunológicos^{29,30,31,32,33,34}.

Bueno et al²⁷ relataram sensibilidade de 91,2% com amostras de soro no teste ELISA utilizando antígeno de líquido vesicular de *Taenia crassiceps* e especificidade de 80%.

O líquido vesicular de *T. crassiceps* tem sido usado de forma eficaz no diagnóstico da cisticercose, e as frações 18 e 14 kDa desse antígeno são consideradas específicas para o imunodiagnóstico da NC no teste imunoblot³⁵.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho do teste ELISA para a pesquisa de anticorpos anticisticercos de *Taenia solium*. Para tanto, foi necessário:

- realizar testes ELISA utilizando os antígenos, LV-Tcra e T-Tso em 610 amostras da população geral;
- confirmar as reatividades das amostras pelo imunoblot;
- analisar os parâmetros sorológicos como: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, repetitividade, para cada teste.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras do Grupo Estudo

As amostras de soro do grupo estudo (GE) foram cedidas gentilmente pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, totalizando 610 amostras de indivíduos selecionados para doação sanguínea em banco de sangue, considerados saudáveis e possivelmente representantes da população geral.

Amostras Controle Positivo

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

Amostras Controle Negativo

O controle negativo (CN) utilizado nos ensaios foi uma amostra de soro cedida pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), da USP, e faz parte da coleção de amostras do Departamento de Imunologia dessa mesma faculdade, com sorologia não reagente para cisticercose nos testes ELISA e Imunoblot. Essa amostra foi adicionada aos ensaios em diferentes dias nos testes processados e constituiu-se no controle negativo dos testes.

Amostra Controle Referência

O critério para escolha e obtenção da amostra de controle referência (CR) foi o mesmo utilizado no CN. Essa amostra foi ensaiada nos diferentes dias da execução dos testes com o propósito de correção das absorvâncias das amostras GE, CP e CN, influenciada pelas diferentes condições diárias nos ensaios. Todas as amostras utilizadas foram mantidas em alíquotas a -20°C durante o estudo.

Imunoensaios para Detecção de Anticorpos Anti-*T. solium*

O "ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY" (ELISA) e o imunoblot foram padronizados com titulações em bloco de todos seus reagentes (concentração antigênica, diluição de amostra, conjugado, substrato e cromógeno), bem como tempos de bloqueio, incubações e temperatura.

ELISA

ELISA foram realizados com os antígenos T-Tso (ELISA-Tso), LV-Tcra (ELISA-Tcra) e amostras de soro de todos os grupos. As padronizações dos ensaios ELISA foram feitas de acordo como o antígeno utilizado.

Padronização dos ELISA

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

As placas de microtitulação de poliestireno de fundo plano, não estéreis, de 96 cavidades NUNC™ Maxi-sorp loose (Denmark) foram sensibilizadas com $0,2\mu\text{g}$ do antígeno T-Tso e $0,1\mu\text{g}$ do antígeno LV-Tcra em tampão carbonato/bicarbonato $0,5\text{M}$ pH 9,6 e incubadas a 4°C durante 18 horas em câmara úmida. Após essa etapa de incubação, as microplacas foram lavadas 3 vezes em lavadora automática com solução salina contendo

Tween 20 a 0,05% (salina-T). As placas foram bloqueadas durante 2 horas com $200\mu\text{L}$ de solução composta de leite desnatado Molico (Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil) a 5% em PBS-T a 37°C .

Após lavagem, as amostras de soro foram incubadas diluídas de forma seriada a 1:100 e 1:200, nos testes ELISA-Tcra e ELISA-Tso, foram repetidas as lavagens e, então, adicionado o conjugado diluído a 1:1000 nos testes ELISA-Tcra e 1:3000 para o ELISA-Tso. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e incubadas com ortofenilenodiamina (OPD, Sigma Chem. Co USA) / H_2O_2 30% (Merck, Alemanha).

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

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

Cálculo do Limiar de Reatividade (*cut off*)

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

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

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

Interpretação dos Resultados

O resultado de cada amostra foi expresso pelo

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

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

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

Foi utilizado gel de separação a 15% e gel de empilhamento a 5% em sistema descontínuo. Os antígenos T-Tso e LV-Tcra foram aplicados na proporção de 7 $\mu\text{g}/\text{mm}$, o padrão de peso molecular utilizado foi de 14,4 a 94 kDa (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Suécia). A corrida eletroforética (BioRad Laboratories Inc, Califórnia, EUA) foi realizada a 50V até a passagem da amostra do gel de empilhamento para o gel de separação, quando a voltagem foi aumentada e mantida a 100V, até a chegada do marcador azul de bromofenol (Pharmacia Biotech, Suíça) ao final do gel.

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

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

As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3mm, lavadas em PBS-T e bloqueados os sítios reativos remanescentes durante 2 horas em tampão de bloqueio (solução de leite desnatado 5% em PBS-T pH 7,2), sob agitação constante a temperatura ambiente. Como diluente de amostra foi utilizada solução de leite desnatado a 1% em PBS-T. Seguido o bloqueio, as tiras foram lavadas 3 vezes em PBS-T e incubadas com amostras de soro diluídas a 1:50 por 18 horas a 4°C.

Após a incubação das amostras, repetiram-se as lavagens e foi adicionado 800 μl do conjugado anti-IgG humana biotilado/avidina-peroxidase (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) diluído a 1:2000 por 1 hora. A reação foi revelada com substrato cromogênico, preparado com 3,0mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma)

dissolvido em 1,0mL de metanol e 5,0mL de solução tris-salina (Tris-hydroxymethylaminoethane a 0,01 M e NaCl a 0,15M, pH 7,5), acrescido de 5,0 μl de H_2O_2 , por 15 minutos. A reação foi interrompida com lavagens em água.

Interpretação dos Resultados do Imunoblot

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

RESULTADOS

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

Os resultados em índice de reatividade obtidos na pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T. solium* nas amostras do grupo GE e CP estão apresentados na figura 1.

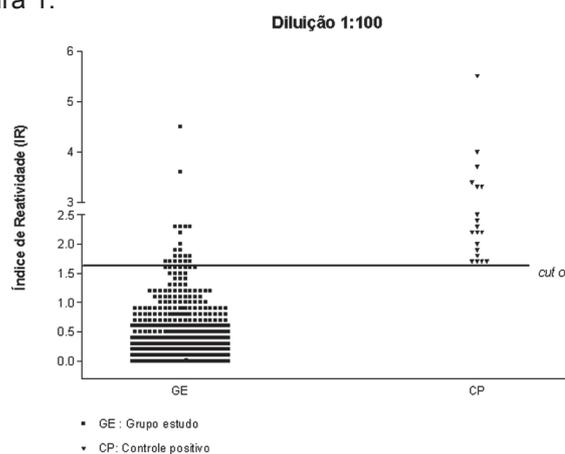


Figura 1: Resultados em IR obtidos para as 610 amostras de soro do GE e amostras CP na diluição 1:100 no ELISA-Tcra para a pesquisa de anticorpos anticisticercos de *T. solium*.

As amostras do GE apresentaram uma variação no IR entre 0,02 e 4,50 (Média=0,48; DP=0,51) utilizando a diluição 1:100. O limiar de reatividade (cut off) calculado foi estimado em $IR \geq 1,7$ e, das 610 amostras do GE testadas 24 (3,9%) apresentaram IR acima desse cut off. Pelo critério estabelecido de positividade, essas amostras foram selecionadas para o teste confirmatório imunoblot utilizando antígeno líquido vesicular de *T. crassiceps* (IB-Tcra).

Nas amostras CP houve variação de 1,7 a 5,5 (Média=3,6; DP=2,7) na diluição 1:100; a variação da amostra CP ficou entre 1,4 a 10,5 (Média=5,6; DP=4,6).

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

Os resultados em índice de reatividade (IR) obtidos na pesquisa de anticorpos anticisticercos de *T. solium* nas amostras do grupo GE e do grupo CP estão apresentados na figura 2.

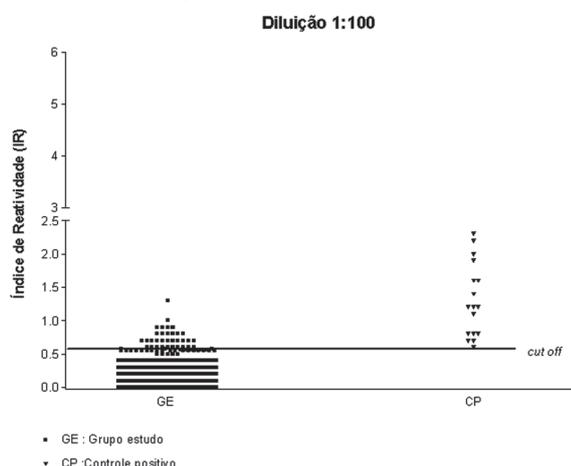


Figura 2: Resultados em índice de reatividade (IR) obtidos para as amostras do grupo estudo e controle positivo na diluição 1:100 no ELISA-Tso para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T. solium*.

Os valores de IR do ELISA-Tso para pesquisa de anticorpos anticisticercos de *T. solium* nas amostras do GE na diluição 1:100 variaram entre 0,01 a 1,30 (Média=0,23; DP=0,18). Das 610 amostras testadas, 33 (5,4%) apresentaram IR $\geq 0,60$ com diluição 1:100; essas amostras por critérios de positividade proposta no trabalho foram selecionadas para o imunoblot utilizando o antígeno T-Tso (IB-Tso).

Os valores de IR no teste para as amostras CP variaram entre 0,7 a 2,8 (Média=1,7; DP=0,71) utilizando a diluição 1:100.

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

Antígeno	Diluição amostra	Positividade no teste ELISA nas amostras do GE, n (%)
LV-Tcra	1:100	24 (3,9%)
T-Tso	1:100	33 (5,4%)

Tabela 1: Positividade das amostras GE testadas no teste ELISA utilizando antígenos LV-Tcra e T-Tso.

IMUNOBLLOT utilizando Antígeno de *T. solium* e *T. crassiceps*

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

O teste IB-Tcra foi ensaiado com 24 (3,9%) das 610 amostras de soro do GE que apresentaram IR

$\geq 1,7$ no ELISA-Tcra na menor diluição, 1:100. Em todas as amostras ensaiadas foi observada a ausência de reatividade específica, portanto não reativas. Os resultados obtidos no IB-Tcra utilizando algumas amostras do GE positivas no ELISA-Tcra estão ilustrados na figura 3.

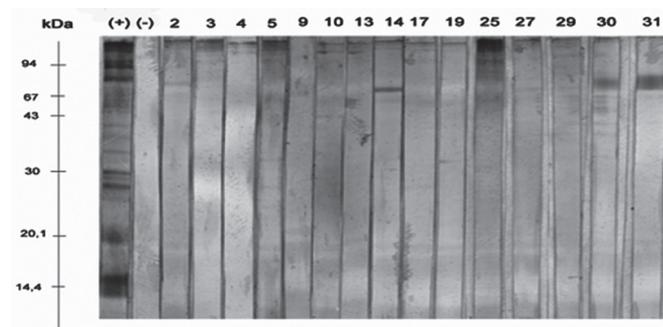


Figura 3: Resultados do IB-Tcra utilizando amostras do GE reativas no ELISA-Tcra, controle positivo e controle negativo.

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

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

O teste foi realizado utilizando as 33 amostras do GE consideradas positivas, com IR acima do cut off estabelecido quando ensaiadas no ELISA-Tso na diluição 1:100.

Os resultados obtidos mostram a ausência de reatividade específica (não reatividade) no IB-Tso utilizando as 33 amostras do GE positivas no ELISA-Tso. O aspecto do IB-Tso representado por algumas amostras está apresentado na figura 4.

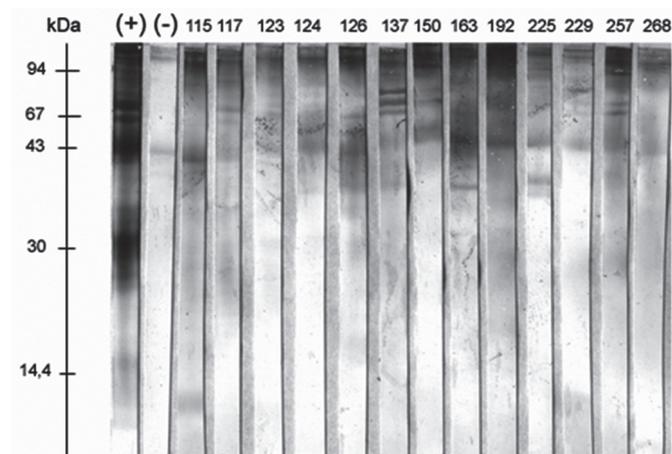


Figura 4: Resultado do IB-Tso utilizando as amostras do GE reativas no ELISA-Tso, controle positivo e controle negativo.

O critério de positividade para o IB-Tso foi estabelecido pela reatividade com as frações 18 e 28 kDa, consideradas específicas. Dezesesseis (48,5%) amostras testadas no IB-Tso para a pesquisa de anticorpos anticisticercos de *T. solium* apresentaram reatividade com frações > 30 kDa consideradas inespecíficas, e nas demais amostras (17) não foi observada reatividade com nenhuma fração.

Das 16 amostras com reatividade inespecífica no IB-Tso, 6 (37,5%) amostras apresentaram $IR \geq 0,9$ no ELISA-Tso. A variação do IR esteve entre 0,6 a 1,7. A distribuição dos resultados das amostras séricas testadas no IB-Tso, IB-Tcra em não reativas e reativas com frações > 30 kDa está expressa na tabela 2.

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

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

Parâmetros para validação

Com o objetivo de validar um teste ELISA que apresente melhor perfil diagnóstico da cisticercose em inquéritos sorológicos, foram analisados e calculados os parâmetros para validação a partir dos dados expressos nos resultados.

Sensibilidade

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

Especificidade

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

No ELISA-Tcra utilizando a diluição 1:100, o teste apresentou uma especificidade de 96,2%. No ELISA-Tso, também utilizando a diluição 1:100, a especificidade calculada ficou em 94,8%.

Valor Preditivo Positivo (VPP)

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

No ELISA-Tcra utilizando a diluição 1:100, para uma prevalência de 0,1% o VPP ficou em 2,0%, utilizando as prevalências de 0,5; 1,0 e 5,0% o VPP foi fixado em 13,2; 21 e 58%, respectivamente.

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

Valor Preditivo Negativo (VPN)

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

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

DISCUSSÃO

Embora relevantes, poucos estudos soroepidemiológicos têm sido conduzidos para investigação da cisticercose humana, principalmente pela deficiência nos métodos diagnósticos aplicáveis na pesquisa de campo.

Inquéritos sorológicos representam também uma forma de avaliação de técnicas imunológicas em larga escala, tendo em vista a facilidade de ensaiar grande número de amostras séricas³⁶.

A escolha de um extrato antigênico para utilização e posterior validação de um teste ELISA que se destina ao estudo de população geral passa por algumas prerrogativas; no que se refere à especificidade se tem demonstrado cada vez mais a necessidade de melhores índices, a fim de evitar a utilização de testes confirmatórios, o que gera custo sobressalente.

A obtenção de extratos antigênicos homólogos em quantidades adequadas para a utilização em estudo de larga escala é dificultada pela obtenção de suínos naturalmente infectados com larvas de *T. solium*, assim como sua difícil manipulação. O emprego do extrato antigênico de líquido vesicular de *T. crassiceps* para verificação de anticorpos anticisticercos nos testes ELISA e imunoblot, em amostras de soro, em nosso meio, foi feito por Vaz³³ e Bueno²⁷, com boa eficiência para uso

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

A pesquisa de anticorpos anticisticercos de *T. solium* nas amostras de soro do grupo de estudo revelou uma especificidade respectivamente de 96,2% e 94,8% no teste ELISA-Tcra e ELISA-Tso utilizando a diluição 1.

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

Essa inespecificidade observada no antígeno Tso é caracterizada pela expressão de proteínas de alto peso molecular (> 30 kDa), que foi demonstrada em 16 (48,5%) amostras das 33 ensaiadas no IB-Tso.

A sensibilidade do teste que se refere à porcentagem de resultados positivos nas amostras de indivíduos sabidamente doentes (CP) foi de 100% – das 20 amostras ensaiadas todas apresentaram reatividade. Desse modo, o valor preditivo negativo do teste também foi estipulado em 100%. Devido à variação da especificidade e à utilização de diferentes prevalências, o valor preditivo positivo do teste variou entre 1,8 a 50%. Se analisarmos pela ótica em que a prevalência da doença no Brasil provavelmente se encontra entre 0,1 a 1,0%, o VPP está baixo, variando entre 1,8 a 16,2% e, pensando nos serviços de neurologia e neuropsiquiatria em que a prevalência chega a 5,0%³⁷, um VPP de 50% continua baixo.

No ELISA-Tcra utilizando a diluição 1:100, 24 (3,9%) amostras das 610 ensaiadas do GE apresentaram reatividade, sendo portanto selecionadas para o IB-Tcra. Das 24 amostras testadas no IB-Tcra, 21 (87,5%) não apresentaram reatividade, sendo que apenas 3 amostras apresentaram frações > 30 kDa. As frações imunodominantes consideradas como critério de reatividade foram as de peso molecular 18 e 14 kDa. A sensibilidade do teste foi de 100% assim como o VPN, porém o mesmo desempenho não foi observado para o VPP que na prevalência de 0,1% ficou em 2%. Aumentando o índice em 5% de prevalência o valor preditivo positivo foi de 58%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sotelo J, Guerrero V, Rubio F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Arch Intern Med*. 1985 Mar;145(3):442-5.
- Cantú C, Barinagarrementeria F. Cerebrovascular complications of neurocysticercosis. Clinical and neuroimaging spectrum. *Arch Neurol*. 1996 Mar;53(3):233-9.
- McManus DP. Abstract Molecular technology: improving strategies for controlling hydatid disease and cysticercosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1990 Jun;21(2):161-73
- Sarti E, Rajshekhar V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Trop*. 2003 Jun;87(1):137-43.
- Garcia HH, Gilman RH, Catacora M, Verastegui M, Gonzalez AE, Tsang VC. Serologic evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. Cysticercosis Working Group in Peru. *J Infect Dis*. 1997 Feb;175(2):486-9.
- Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect*. 2000 Dec;2(15):1875-90.
- Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop*. 2003 Jun;87(1):43-51.
- Schantz PM, Tsang VC. The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and research and control of cysticercosis. *Acta Trop*. 2003 Jun;87(1):161-3.
- Agapejev S. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996 May-Jun;38(3):207-16.
- Vianna LG, Macêdo V, Costa JM, Mello P, de Souza D. Seroepidemiologic study of human cysticercosis in Brasilia, Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1986 Jul-Sep;19(3):149-56.
- Del Brutto OH, Sotelo J, Roman GC. Therapy for neurocysticercosis: a reappraisal. *Clin Infect Dis*. 1993 Oct;17(4):730-5.
- Schenone H, Villarroel F, Rojas A, Ramírez R. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. 1982:25-38.
- Machado AB, Pialarissi CS, Vaz AJ. Human cysticercosis diagnosed at a general hospital. *Rev Saúde Pública*. 1988 Jun;22(3):240-4.
- Spina-França A, Livramento JA, Machado LR. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). *Arq Neuropsiquiatr*. 1993 Mar; 51(1):16-20.
- Livramento JA, Machado LR, Spina-França A. Immunobiology of neurocysticercosis. In: Ferjeman, N, Chamoles, NA. New trends in pediatric neurology. Amsterdam: Elsevier Science; 1993:p.307-12.
- Vaz AJ, Livramento JA. Neurocysticercose. In: Ferreira AW, Avila SLM. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. 2001:316-22.

17. Machado LR, Nobrega JPS, Barros NG, Livramento JA, Bacheschi LA, Spina-França A. Computed topography in neurocysticercosis: a 10 years long evolution analysis of 100 patients with an appraisal of a new classification. *Arq Neuropsiquiatr*. 1999;48(4):414-8.
18. Schroth G, Kretzschmar K, Gawehn J, Voigt K. Advantage of magnetic resonance imaging in the diagnosis of cerebral infections. *Neuroradiology*. 1987;29(2):120-6.
19. Garcia-Rosales JJ, Quiroz MG, Chacón RA. Utilidad de los métodos: Elisa, hemaglutinación indirecta y fijación del complemento en el diagnóstico de la cisticercosis en niños. *Rev Latinoamer Microbiol*. 1990;32:197-207.
20. Flisser A, Sarti E, Lightowlers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop*. 2003 Jun;87(1):43-51.
21. Biagi FF, Piña AP. Presence of antigens in calcareous corpuscles of cysticercus. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1964 Jun;6(3):114-6.
22. Arambulo PV 3rd, Walls KW, Bullock S, Kagan IG. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). *Acta Trop*. 1978 Mar;35(1):63-7.
23. Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med*. 1990 Sep;114(9):926-8.
24. Nascimento E, Nogueira PM, Tavares CA. Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. *Parasitol Res*. 1987;73(5):446-50.
25. Morakote N, Nawacharoen W, Sukonthasun K, Thammasonthi W, Khamboonruang C. Comparison of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1992 Mar;23(1):77-81.
26. Ramos-Kuri M, Montoya RM, Padilla A, Govezensky T, Díaz ML, Sciutto E, et al. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. Disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients. *Arch Neurol*. 1992 Jun;49(6):633-6.
27. Bueno EC, Vaz AJ, Machado LD, Livramento JA, Mielle SR. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan;38(1):146-51.
28. Freeman RS. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. *Can J Zoo*. 1962;40.
29. Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med*. 1990 Sep;114(9):926-8.
30. Garcia HH, Parkhouse RME, Gilman RH, Verastegui M, Gonzalez AE, Tsang VCW. Serological evolution of neurocysticercosis patients alter antiparasitic therapy. *J Infect Dis*. 1997;175:486-9.
31. de Andrade AP, Vaz AJ, Nakamura PM, Palou VS, da Cunha RA, Ferreira AW. Immunoperoxidase for the detection of antibodies in cerebrospinal fluid in neurocysticercosis: use of *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus longicollis* particles fixed on microscopy slides. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996 Jul-Aug;38(4):259-63.
32. Ferreira AP, Vaz AJ, Nakamura PM, Sasaki AT, Ferreira AW, Livramento JA. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997 Jan-Feb;39(1):29-33.
33. Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RM, Livramento JA, Da Silva MV, Nakamura PM, et al. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Sep;57(3):354-7.
34. Espindola NM, De Gaspari EN, Nakamura PM, Vaz AJ. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. *Vet Parasitol*. 2000 May 17;89(4):321-6.
35. Espindola NM, Iha AH, Fernandes I, Takayanagui OM, Machado Ldos R, Livramento JA, et al. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. *J Clin Microbiol*. 2005 Jul;43(7):3178-84.
36. Vaz AJ, Hanashiro AS, Chieffi PP, Ferreira AW. Frequency of patients with anti-*Cysticercus cellulosae* blood antibodies in 5 municipalities of the state of Sao Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1990 Apr-Jun;23(2):97-9.