

EMPREGO DE ANTÍGENOS DE LARVA DE *TAENIA CRASSICEPS* EM TESTE ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE CISTICERCOSE SUÍNA

UTILIZATION OF *TAENIA CRASSICEPS* LARVAE ANTIGEN IN THE ELISA TEST FOR THE SWINE CYSTICERCOSIS DIAGNOSIS

Lilian Lameck MONTEIRO¹, Paulo Sérgio de Arruda PINTO², Jackson Victor de ARAÚJO³, Adelaide José VAZ⁴, Shara Regina da SILVA⁵, Daniela Carla Bernardes SILVA⁶

RESUMO: O experimento foi realizado com o objetivo de aprimorar o esquema de padronização do teste ELISA para diagnóstico da cisticercose suína, utilizando diferentes modalidades de antígenos obtidos de larvas de *Taenia crassiceps*. Nos ensaios realizados com esta finalidade foram utilizados o antígeno total (T), de membrana (M) e líquido vesicular (V). Em face do menor desempenho do antígeno de membrana, o mesmo foi dispensado nos ensaios decisivos. As sensibilidades, para os antígenos V e T, foram de 86% e 79% e as especificidades de 97% e 96%, respectivamente. Diante destas altas taxas de desempenho, o teste ELISA pode ser empregado, com segurança, para aplicação no diagnóstico da cisticercose suína.

UNITERMOS: Cisticercose suína, *Taenia crassiceps*, ELISA, Antígeno.

INTRODUÇÃO

A cisticercose causada pela *Taenia solium* afeta suínos e acidentalmente o ser humano, sendo ainda um sério problema de saúde pública em vários países onde a pobreza e a falta de higiene favorecem a sua transmissão (DE ALUJA et al., 1996). Como os suínos são os hospedeiros intermediários, a prevalência da cisticercose suína é um indicador confiável de zonas de transmissão ativa (SCIUTTO et al., 1998).

Os testes imunológicos têm atingido destacado espaço no diagnóstico da cisticercose humana e mais recentemente da suína, como alternativa aos demais, devendo serem padronizados para assegurarem um bom desempenho.

T. crassiceps é um cestódeo comum em raposas na Europa, cuja forma larvária (*Cysticercus longicollis*) encontrada em pequenos roedores (FREEMAN, 1962), tem sido empregada no preparo de antígenos para diagnóstico da cisticercose.

A substituição do antígeno de larvas de *T. solium* pelo de *T. crassiceps* foi reforçada por Larralde et al. (1990) ao verificar semelhança no desempenho de ambos no teste ELISA para cisticercose humana, através das taxas de sensibilidade e de especificidade. Outra vantagem do emprego dos antígenos de *T. crassiceps* está relacionada com a facilidade de manutenção dos cisticercos em laboratório.

Antígenos de *T. crassiceps* são facilmente obtidos de camundongos infectados experimentalmente (SCIUTTO et al., 1990), o que permite o suprimento adequado de antígeno para padronização de testes de imunodiagnóstico (BIONDI et al., 1996).

O desempenho do teste ELISA obtido por Pinto et al. (2000) foi representado pelas taxas de sensibilidade variando, respectivamente, segundo o ponto de corte com dois (2sd) e três (3sd) desvios-padrão de 96,0% e 80,0% para o antígeno vesicular de larva de *T. crassiceps* (V) e de 100,0% e 92,0% para o total (T); e para especificidade variaram de 97,5% e 100,0% para V e de 98,0% (2sd e 3sd) para T.

Na padronização do teste ELISA para o diagnóstico da cisticercose suína, Pinto et al. (2000) encontraram, respectivamente, como melhores concentrações ou diluições, 2 µg/mL (antígeno), 1:400 (soro) e 1:1000 (conjugado) ao testar o antígeno de líquido vesicular de *T. crassiceps* e 5 µg/mL (antígeno), 1:100 (soro) e 1:20.000 (conjugado) ao testar o antígeno total do mesmo parasita. Neste caso, o ponto de corte foi de 0,879 (2sd) e 1,108 (3sd) para o V; 0,499 (2sd) e 0,558 (3sd) para o T.

Os antígenos de larvas de *T. crassiceps* revelaram desempenho ligeiramente superior aos de larvas de *T. solium* no teste ELISA, principalmente quanto à sensibilidade, segundo Pinto et al. (2000). Entretanto os antígenos de ambos os parasitas mostraram resultados

¹Estudante de Mestrado - Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa

²Prof. Adjunto III - Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa

³Prof. Adjunto III - Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa

⁴Prof^ª Dr^ª - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

⁵Médica Veterinária - Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa

⁶Estudante de Graduação - Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa

Received: 10/03/03 Accept: 25/07/03

favoráveis ao seu emprego no diagnóstico da cisticercose suína.

Diante de uma alternativa prática e possivelmente mais eficiente de diagnóstico da cisticercose suína através do teste ELISA, ficarão favorecidas as ações de saúde pública e de sanidade animal, na medida que os registros dos dados de sua ocorrência serão aprimorados e poderão nortear medidas racionalizadas de controle, principalmente nos sistemas clandestinos de criação, abate e comercialização da carne.

O presente trabalho apresentou como objetivos:

-Verificação da reprodutibilidade das condições ótimas de padronização do teste ELISA, como: concentração de antígenos, soros e conjugado e tipo de substância bloqueadora.

-Comparação de diferentes modalidades de antígenos de larvas de *T. crassiceps* no teste ELISA: vesicular, de membrana e total.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Amostragem (soros)

Foram utilizados 14 amostras de soros de suínos com cisticercose comprovada através do exame *post-mortem* (anatomopatológico), 60 amostras de soros negativos e 58 amostras de soros de suínos portadores de outras patologias, como: hidatidose (8), macracantorrhincose (9), ascaridiose (27) e pneumonia (14).

2) Obtenção e preparo dos antígenos

As formas larvárias de *T. crassiceps* foram mantidas por infecção experimental com inoculação intraperitoneal de cinco a dez parasitas, formas pequenas sem brotamentos visíveis, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas, com auxílio de agulha de calibre 25×7 e cerca de 0,2mL de Solução Salina Tamponada Fosfatada (PBS). Após 90 dias, os animais com aumento de volume abdominal foram sacrificados e os parasitas foram retirados por lavagem da cavidade peritoneal. Os cisticercos foram lavados em PBS, sendo eliminados aqueles em fase de degeneração ou calcificação e utilizados no preparo dos antígenos, como descrito a seguir

Preparo dos antígenos

a) Técnica utilizada no preparo do antígeno vesicular (V_1)

Os cisticercos obtidos foram centrifugados a 35.000 x g, durante 30 minutos, à 4°C e o sobrenadante (antígeno) separado e posteriormente estocado a -20°C. O sedimento também foi destinado ao preparo do antígeno de membrana.

b) Técnica utilizada no preparo do antígeno total (T_1)

Os cisticercos íntegros foram desidratados "overnight" por liofilização e posteriormente triturados em gral. Ao pó obtido foi adicionada solução salina 0,15M na proporção de 10%. A mistura obtida foi homogeneizada em homogeneizador de tecido tipo Potter, em banho de gelo, durante 10 minutos e centrifugada à 17.400 x g, durante 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi separado do sedimento, constituindo o antígeno, que foi estocado a -20°C.

c) Técnica utilizada no preparo do antígeno de membrana (M)

Seguiu-se o mesmo procedimento do preparo do antígeno total (T_1), partindo do sedimento final obtido no preparo do antígeno vesicular (V_1).

d) Técnica utilizada no preparo dos antígenos tratados pelo ultrassom (V_2 e T_2).

-Mesmo preparo dos anteriores (V_1 e T_1), porém submetidos, no final, ao ultrassom a 20 watts e 20.000 hertz, durante 4 ciclos de 30 segundos.

3) Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita conforme método preconizado por Lowry et al. (1951).

4) Fases de padronização do teste ELISA indireto

4.1) Ensaios preliminares

Foram realizados testes com todos os antígenos preparados e alguns soros-controle discriminados na amostragem.

Pela técnica ELISA adotada, utilizou-se placas de poliestireno fundo chato (CORNING), que foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6 durante 12 horas a 4°C, antecedidas por incubação à temperatura ambiente durante uma hora. Após lavagens em solução salina contendo 0,05% de tween-20, foi realizado o bloqueio dos sítios reativos (PBS pH 7,4, leite desnatado,

Molico - Nestlé, a 5%) por 1 hora a 37°C. Novas lavagens foram realizadas e as amostras foram diluídas em PBS pH 7,4, leite desnatado a 1% e a placa incubada por 30 minutos a 37°C. Após lavagens, foi adicionado o conjugado, anti-IgG de suíno marcada com peroxidase A-5670 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e repetidos os procedimentos de incubação e lavagem. A reação foi revelada com solução de OPD (0,1%) e H_2O_2 0,003% em tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, durante um período de incubação de 5 minutos. A reação foi bloqueada com H_2SO_4 4N. As leituras foram realizadas em

espectrofotômetro (Neutral 2001 tipo 101540, Áustria) a 492nm. A quantidade de reagentes aplicados à placa se manteve em 100µl, exceto para a solução bloqueadora, 200µl.

Os parâmetros avaliados na padronização foram: tipo e concentração de antígenos (3, 5, 6, 10, 15, 20 e 30 µg/ml), diluições de soro (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) e conjugado anti-IgG de suíno, marcado com peroxidase (Sigma A-5670), (1:500, 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000), substância bloqueadora dos sítios reativos das placas (leite em pó desnatado, gelatina e albumina). Estes parâmetros foram avaliados a partir da densidade óptica (DO) obtida nos resultados de testes simultâneos de dois soros-controle positivos e quatro negativos.

O critério da determinação do desempenho dos parâmetros foi a amplitude da diferença de DO entre soros positivos e negativos, a qual foi calculada pela divisão da média das DO dos soros positivos pelo ponto de corte com 2sd (desvio-padrão), considerando os quatro soros negativos testados.

4.2) Fase final

A determinação do desempenho final do teste ELISA foi feita através de ensaio de todos os soros-controle

positivos, negativos e de outras patologias, conforme discriminados na amostragem, reagindo-os com os antígenos vesicular (V_1) e total (T_1), não tratados pelo ultrassom, nas melhores condições de padronização, definidas na etapa experimental anterior.

Visando a definição do comportamento dos soros-controle, como positivos ou negativos no modelo de padronização proposto na primeira fase, foram determinados os pontos de corte, que foram representados pela soma da DO média obtida em análise prévia dos soros-controle negativos mais 2sd ou mais 3sd (desvios-padrão). A partir dos dados obtidos, foram determinadas as taxas de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Melhores resultados foram obtidos com o uso do antígeno do líquido vesicular à concentração de 3µg/ml e do total a 20µg/ml (Figuras 1 e 2).

Após avaliação preliminar, por intermédio do teste ELISA, observou-se que a inclusão do tratamento com ultrassom não influenciou no desempenho dos antígenos (resultados não apresentados).

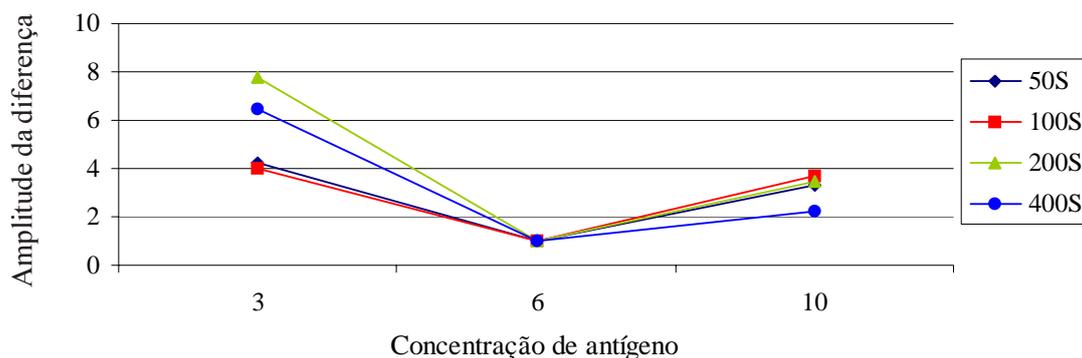


Figura 1. Amplitude da diferença entre DO de soros de suínos positivos e negativos para cisticercose, por concentração de antígeno vesicular e diluição (1/...) de soro (S)

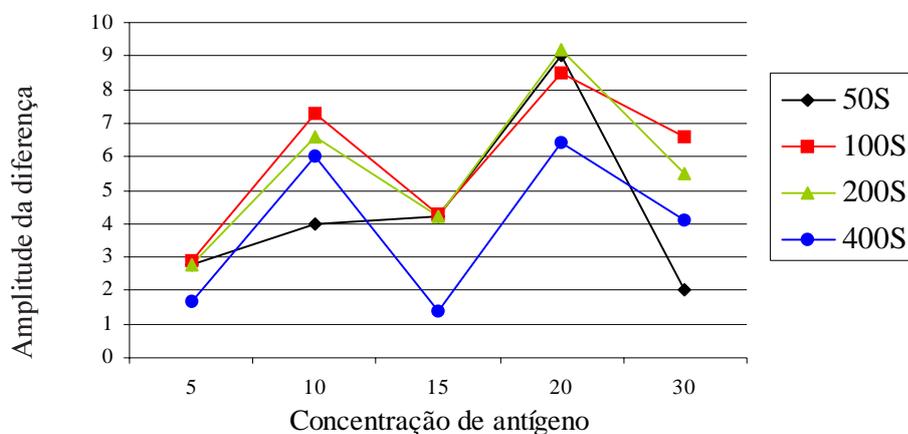


Figura 2. Amplitude da diferença entre DO de soros de suínos positivos e negativos para cisticercose, por concentração de antígeno total e diluição (1/...) de soro (S)

Comparando os diferentes tipos de antígenos com mesma concentração, verificou-se que o antígeno de membrana apresentou resultados desfavoráveis em relação aos demais.

Melhores resultados foram obtidos com as diluições de conjugado de 1:1.000 para o antígeno de líquido vesicular e de 1:10.000 para o total (Figuras 3 e 4).

Deve-se esclarecer que, apesar das amplitudes da diferença entre soros positivos e negativos determinadas após o uso do conjugado 1:20.000 para o antígeno vesicular, terem sido maiores em relação às obtidas com o conjugado 1:1.000, este último foi preferido por ter proporcionado um valor mais alto de DO nas reações, o que diminui a mar-

gem de erros em cálculos.

Considerando os diversos ensaios realizados com diferentes diluições de soro, a diluição 1:100 foi a preferida por apresentar, na maioria das vezes, uma amplitude da diferença maior que as outras. Apesar das diluições 1:200 e 1:400 terem apresentado maior amplitude em algumas ocasiões, ainda considerou-se que a diluição 1:100 proporciona menor chance de erros nos cálculos, nas referidas ocasiões, pois os seus valores de DO foram maiores que os das outras (Figuras 1, 2, 3 e 4).

O leite em pó foi a melhor substância bloqueadora, seguido pela gelatina, concordando com Pinto et al. (2000).

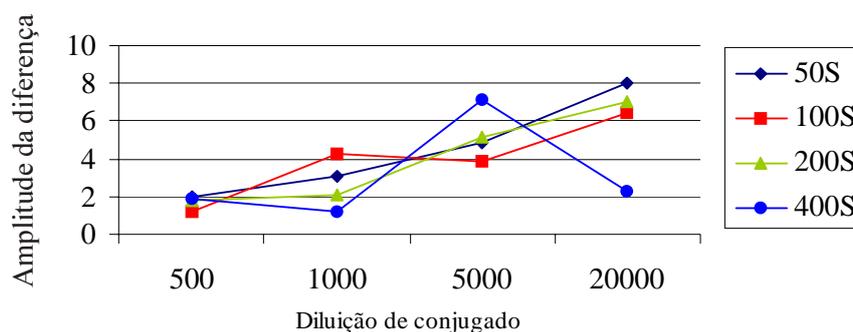


Figura 3. Amplitude da diferença entre DO de soros de suínos positivos e negativos para cisticercose, por diluições (1/...) de conjugado e soro (S), para o antígeno vesicular

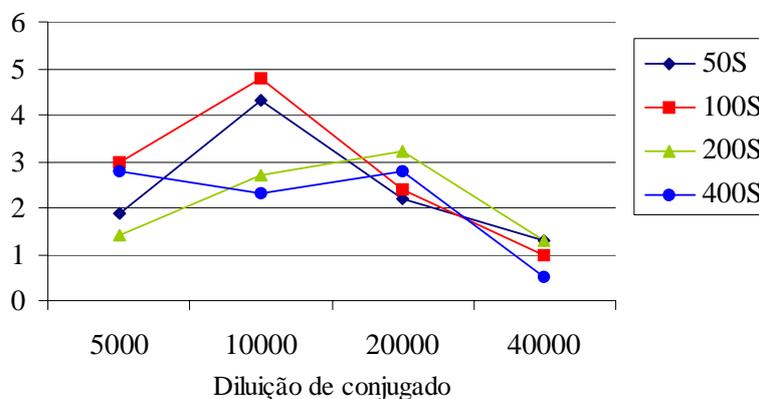


Figura 4. Amplitude da diferença entre DO de soros de suínos positivos e negativos para cisticercose, por diluições (1/...) de conjugado e soro (S), para o antígeno total

Os resultados do ensaio final de padronização empregando todos os soros-controle, bem como as taxas de desempenho do teste ELISA estão representados pela tabela 1.

Ocorreu apenas uma reação inespecífica, com soro negativo, que se restringiu ao antígeno vesicular. Quanto às reações cruzadas, elas ocorreram com o antígeno vesicular, apenas nos soros procedentes de animais com ascaridiose (dois) e com o antígeno total nos soros de ascaridiose (três), hidatidose (um) e macracantorrinose (um).

Em face de sua interferência no desempenho do teste ELISA, a decisão sobre o emprego de 2sd ou 3sd como critério de ponto de corte dependerá da finalidade da pesquisa, 3sd (maior especificidade) é mais apropriado para fins de diagnóstico e 2sd (maior sensibilidade) para triagem. Nesta pesquisa, a opção por 2sd apresentou taxas de desempenho mais convincentes, pois revelaram sensibilidade expressivamente maior reduzindo muito pouco a especificidade.

Comparando os dois antígenos (vesicular e total),

verificaram-se desempenhos semelhantes, embora o antígeno vesicular tenha apresentado taxas superiores de sensibilidade e de valor preditivo positivo.

A bibliografia (Biondi et al., 1996, De aluja et al., 1996, Pinto et al., 2000) tem mostrado grande variação em valores de ponto de corte do teste ELISA, dificultando o estabelecimento de valores ou faixas mais recomendáveis para representar um ponto de corte genérico. Estas variações parecem estar relacionadas com a falta de padroni-

zação e de reprodutibilidade dos procedimentos empregados na técnica do teste ELISA para o diagnóstico da cisticercose suína, sobretudo, quanto às concentrações e tipos de reagentes utilizados caso a caso.

A reprodutibilidade dos resultados desta pesquisa foi satisfatória em relação aos obtidos por Pinto et al. (2000), mostrando ligeira queda das taxas de sensibilidade e valor preditivo positivo, concordando, porém, com as altas taxas de especificidade e valor preditivo negativo.

Tabela 1. Avaliação final do teste ELISA para diagnóstico da cisticercose suína, segundo o tipo de antígeno (vesicular ou total) e critério de desvio-padrão (2sd e 3sd) adotado no ponto de corte

Reações e Taxas de Desempenhos	Vesicular		Total	
	2sd	3sd	2sd	3sd
Reação Positiva/Total	12/14	9/14	11/14	10/14
Reação Negativa/Total	115/118	116/118	113/118	116/118
Reação Inespecífica	1	0	0	0
Reação Cruzada	2	2	5	2
Sensibilidade (%)	86	64	79	71
Especificidade (%)	97	98	96	98
Valor Preditivo + (%)	80	82	69	83
Valor Preditivo - (%)	98	96	97	97

CONCLUSÃO

Com sensibilidade de 86% para o antígeno vesicular e de 79% para o total, especificidade de 97% e 96% e valor preditivo negativo de 98% e 97%, respectivamente, o

teste ELISA, com o emprego de antígenos de larvas de *T. crassiceps*, mostrou altas taxas de desempenho, podendo ser empregado com segurança no diagnóstico da cisticercose suína.

ABSTRACT: The experiment was performed to the ELISA test standardization for the diagnosis of swine cysticercosis, in order to verify the reproductibility of the other standardization models, using different antigens types obtained from *Taenia crassiceps* larvae. The assays was accomplished with the total (T), membrane (M) and vesicular liquid (V) antigens. The membrane antigen was excluded to the decisive assays, because of this poor performance. The sensitivities rate for the V and T antigens used were 86% and 79%, and the specificities were 97% and 96%, respectively. Since its high performance rates, the ELISA test was behaved as an safe method to the diagnosis of swine cysticercosis.

UNITERMS: Swine cysticercosis, *Taenia crassiceps*, ELISA, Antigen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 64, p. 261-266, 1996.

DE ALUJA, A. S.; VILLALOBOS, A. N. M.; PLANCARTE, A.; RODARTE, L. F.; HERNANDEZ, M.; SCIUTTO, E. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 61, p. 49-59, 1996.

- FREEMAN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. **Can. J. Zool.** v. 40, p. 969-990, 1962.
- 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. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 114, p. 926-928, 1990.
- LOWRY, W. O.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.
- PINTO, P. S. A.; VAZ, A. J.; GERMANO, P. M. L.; NAKAMURA, P. M. ELISA test for the diagnosis of cysticercosis in pigs using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 71-79, 2000.
- SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; TRUEBA, L.; LEMUS, D.; MONTOYA, R. M.; DIAZ, M. L.; GOVEZENSKY, T.; LOMELI, C.; TAPIA, G.; LARRALDE, C. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. **Parasite Immunol.**, v. 12, p. 687-696. 1990.
- SCIUTTO, E.; HERNANDEZ, M.; GARCIA, G.; DE ALUJA, A. S.; VILLALOBOS, A. N. M.; RODARTE, L. F.; PARKHOUSE, M.; HARRISON, L. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 78, p. 185-194, 1998.