

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA CISTICERCOSE
BOVINA

Silvana de Cássia Paulan
Bióloga

ARAÇATUBA – SP
2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA CISTICERCOSE
BOVINA**

Silvana de Cássia Paulan

Orientadora: Profa. Adjunto Cárís Maroni Nunes

Dissertação apresentada a Faculdade Medicina Veterinária – Unesp, Campus Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P324d Paulan, Silvana de Cássia.
Diagnóstico sorológico da cisticercose bovina / Silvana de Cássia Paulan. - Araçatuba: [s.n.], 2011
41 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária
Orientadora: Profª. Dra. Cárís Maroni Nunes

1. Anticorpo monoclonal 2. ELISA 3. Inspeção sanitária
4. Taenia saginata

CDD 636.20896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

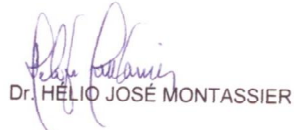
TÍTULO: Diagnóstico sorológico da cisticercose bovina

AUTORA: SILVANA DE CÁSSIA PAULAN

ORIENTADORA: Dr.ª CÁRIS MARONI NUNES

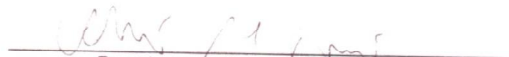
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr.ª VALÉRIA MARÇAL FÉLIX DE LIMA


Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER


Dr.ª CÁRIS MARONI NUNES

DATA DA REALIZAÇÃO: 05 de agosto de 2011.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr.ª CÁRIS MARONI NUNES
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES

SILVANA DE CÁSSIA PAULAN – nascida na cidade de São Bernardo do Campo – SP em 23 de fevereiro de 1979. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Ilha Solteira, em janeiro de 2009. Realizou Iniciação Científica na área de Imunoparasitologia. Possui 02 artigos publicados na área de imunoparasitologia e 16 resumos apresentados em congressos nacionais e internacionais.

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ademir e Lourdes, pela compreensão, carinho e apoio incondicionais.

À minha irmã Suzi, pelos conselhos e pela cumplicidade.

Ao Otton Garcia de Arruda, por seu carinho, incentivo e apoio.

Ao meu amigo Cícero, pelas conversas café afora e confiança.

À Amanda P. N. Quintal, pela energia, amizade e confiança em meu potencial.

À Fúlvia Di Pillo pela amizade e por todo apoio.

À todos que de alguma forma fizeram parte, acreditando e apoiando minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

À CAPES e FAPESP, pelas bolsas de estudo durante o Mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À Dra. Cárís Maroni Nunes, pela oportunidade de desenvolver este projeto de Mestrado, sendo tão competente orientadora e amiga.

À equipe do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, aos mestrandos Érica de Souza Ribeiro, Fernanda Müller de Oliveira, Yuri Tani Utsunomiya e Danielly Bortoletto; aos doutorandos Adriana Santana do Carmo e Samuel Carvalho de Aragão; ao técnico Pedro Florindo, por auxiliarem a execução deste trabalho, por compartilhar pensamentos e por todo apoio.

À Pós-Doutoranda Sarita Gobbo pela troca de experiência e pela amizade.

À Dra. Edda Sciutto, do Instituto de Investigaciones Biomedicas da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), pelo estágio concedido e pelo auxílio para o desenvolvimento deste projeto, disponibilizando amostras de extratos antigênicos.

Ao Dr. Robert M. E. Parkhouse, do Instituto Gulbenkian de Ciências, Portugal, por ceder amostras de anticorpos monoclonais, utilizados neste projeto.

Aos médicos veterinários Leandro Milani Tabian e Paulo Gomes da Silva, do frigorífico Marfrig, Promissão - SP; Antonio Mandarini e Jorge Luis Lopes Alonso, do frigorífico Tatuibí, Santa Fé do Sul – SP; Vinícius Gimenes e Jose Osmar M. Fernandes, do frigorífico JBS, Andradina – SP e Paulo Lopes e Wagner Maschio, do frigorífico JBS, Lins – SP, por todo auxílio durante a coleta de amostras de sangue de bovinos e de formas metacestóides de *Taenia saginata*.

À todos que direta ou indiretamente participaram deste projeto.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	9
AGENTE ETIOLÓGICO.....	9
CICLO BIOLÓGICO	10
COMPLEXO TENÍASE-CISTICERCOSE POR <i>TAENIA SAGINATA</i>	11
DIAGNÓSTICO	12
OBJETIVO.....	17
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2 – COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA ...	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
AMOSTRAS BIOLÓGICAS	25
TESTE ELISA INDIRETO	26
TESTE ELISA SANDUÍCHE	27
ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	37

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA CISTICERCOSE BOVINA

RESUMO - A cisticercose bovina, causada pela forma metacestóide de *Taenia saginata*, é responsável por prejuízos econômicos devido à desvalorização de carcaças infectadas. A inspeção sanitária tem sido a principal forma de diagnóstico desta zoonose, porém apresenta baixa sensibilidade em identificar animais com infecção menos intensa. Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos e de antígenos representam importante alternativa de diagnóstico *ante mortem* para a identificação de animais infectados, pois apresentam maior sensibilidade. Neste trabalho foram avaliadas a detecção de anticorpos anti-*Taenia saginata* e de antígenos do mesmo parasita em amostras de soro de bovinos naturalmente infectados, por meio dos testes ELISA indireto e ELISA sanduíche, respectivamente. Além das condições de realização dos testes, como o preparo das soluções e o tipo de extrato antigênico utilizados, a intensidade da infecção é um dos fatores que mais interferem nos resultados diagnósticos. Dessa forma, as características diagnósticas dos testes ELISA indireto, realizado com três diferentes extratos antigênicos, e ELISA sanduíche, realizado com o anticorpo monoclonal HP10, foram também relacionadas com a intensidade de infecção dos bovinos por *Taenia saginata*.

Palavras-chave: anticorpo monoclonal, ELISA, inspeção sanitária, *Taenia saginata*

SEROLOGICAL DIAGNOSIS FOR BOVINE CYSTICERCOSIS

SUMMARY – Bovine cysticercosis caused by *Taenia saginata* metacestodes is responsible for economic losses due to depreciation of the infected carcasses. Sanitary inspection has been the main diagnostic tool but has low sensitivity in animals light infected. Immunoassays for antibodies and antigens detection are important *ante mortem* diagnosis, because present higher sensitivity. Antibodies anti-*T. saginata* and *T. saginata* antigens detection were evaluated in naturally infected bovine serum samples by indirect ELISA and sandwich ELISA. Besides reagents and test conditions the intensity of animal's infection represents one of the most important interfering factors on the diagnostic results. Thus, diagnostic characteristics of indirect ELISA performed with three different antigenic extracts and sandwich ELISA, with monoclonal antibody HP10, were related to the intensity of infection in samples from *Taenia saginata* infected bovines.

Keywords – ELISA, meat inspection, monoclonal antibody, *Taenia saginata*

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Agente etiológico

A classe Cestoda compreende parasitos hermafroditas com corpos dorsoventralmente achatados, providos de órgãos de adesão na extremidade anterior e encontrados em animais vertebrados. Dentre as espécies mais frequentemente encontradas em humanos estão a *Taenia solium* e a *Taenia saginata*, pertencentes à família Taenidae (SILVA, 2003).

Em sua forma adulta apresentam corpo segmentado, tendo na extremidade anterior o escólex, com quatro ventosas formadas por tecido muscular e, no caso de *T. solium*, um rostelo armado com dupla fileira de acúleos. Em seguida há o colo, porção mais delgada, com intensa atividade celular, onde ocorre a formação das proglotes. O restante do corpo é formado pelo estróbilo, contendo as proglotes jovens, maduras e grávidas (SILVA, 2003; OIE, 2008).

As proglotes grávidas de *T. saginata* são retangulares com no máximo 26 ramificações e podem conter até 160 mil ovos, porém nem todos são maduros e férteis; as de *T. solium* são quadrangulares com 12 pares de ramificações dendríticas, podendo conter até 80 mil ovos (SILVA, 2003).

Estes parasitos podem viver muitos anos no intestino delgado humano e atingir comprimento de três a cinco metros, no caso de *T. solium* e de seis a sete metros, no caso de *T. saginata*, havendo, diariamente, a liberação de proglotes grávidas passivamente pelas fezes do hospedeiro ou de forma ativa, no caso de infecção por *T. saginata* (OIE, 2008; PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

Os ovos de *T. saginata* e de *T. solium* são idênticos, apresentando forma ovalada e diâmetro entre 35-45 μm . Possuem uma casca grossa, radialmente estriada e em seu interior apresentam um embrião com seis acúleos, denominado oncosfera. Os ovos são sensíveis à dessecação e à temperatura

elevada, mas podem permanecer viáveis no ambiente por aproximadamente um ano. A dispersão pode ocorrer por contaminação fecal do solo, pelo vento, aves, anelídeos e artrópodes (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; WHO, 2004).

Ciclo biológico

A cisticercose ocorre pela ingestão de ovos de *T. saginata*, por bovinos, e de *T. solium*, por suínos, presentes em pastos ou águas contaminadas por fezes humanas. Após a ingestão, os ovos sofrem a ação da pepsina, que age sobre a substância cementante dos blocos de quitina que constituem a casca do ovo, e da bile, que propicia a ativação da oncosfera, que se evagina e se fixa na parede intestinal do hospedeiro. Num período entre 24 e 72 horas as oncosferas difundem-se pelo organismo, através da corrente sanguínea, instalando-se nos tecidos musculares esqueléticos e cardíacos, formando os cisticercos (SILVA, 2003; PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

A ingestão de carne bovina ou suína crua ou mal cozida contendo cisticercos viáveis, é a principal forma de infecção do homem para teníase. Neste processo, a ação do suco gástrico ativa a larva que se evagina e se fixa, pelo escólex, na parede do intestino delgado, onde se desenvolverá numa tênia adulta. A eliminação de proglotes, através das fezes, inicia-se após 60 ou 70 dias (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

O homem é o hospedeiro definitivo tanto para *T. saginata* quanto para *T. solium*, porém pode servir de hospedeiro intermediário para *T. solium*, através da ingestão de ovos deste parasito por mecanismos como heteroinfecção, através de alimentos e água contaminados, auto-infecção externa, onde o indivíduo elimina proglotes e ovos e as ingere através de contaminação das mãos ou por auto-infecção interna, por movimentos retroperistálticos do intestino. Após a infecção ocorre a formação de cisticercos em vários tecidos,

inclusive no sistema nervoso central, caracterizando quadros de neurocisticercose, grave problema em saúde pública (SILVA, 2003; OIE, 2008).

Complexo Teníase-Cisticercose por *Taenia saginata*

O complexo taeníase-cisticercose, determinado pela *T. saginata*, apresenta distribuição cosmopolita, sendo encontrado principalmente nos países onde há maior atividade na pecuária bovina. É responsável por graves problemas econômicos devido à infecção de bovinos pelas formas metacestóides (cisticercos) e de saúde pública pela teníase humana (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; WHO, 2011).

A determinação da fonte de infecção dos animais e da prevalência da cisticercose é importante para a implantação de programas de controle, porém, nem sempre é possível (FUKUDA et al., 2003).

No Brasil não há dados conclusivos sobre a prevalência da cisticercose bovina (MINOZZO et al., 2002), sendo estes informados pelas anotações do Serviço de Inspeção Federal (SIF) nos frigoríficos durante a realização do exame *post mortem* das carcaças (SOUZA et al., 1997).

Um levantamento dos dados registrados junto ao SIF no Estado de São Paulo, no período compreendido entre 1980 e 2001, revelou uma prevalência média de 4,3%. Porém, a cada ano um percentual maior de animais vindos de áreas com menor índice desta parasitose, como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás é abatido no Estado, gerando informação não correspondente à realidade da doença e sua verdadeira origem (FUKUDA et al., 2003).

A estratégia fundamental para o controle do complexo teníase-cisticercose consiste em interromper o ciclo evolutivo do parasita, a fim de se evitar a infecção nos animais e no homem. O melhoramento das condições de saneamento básico, o tratamento da população, o incremento da inspeção veterinária de produtos cárneos, a eliminação de abate e comércio de produtos clandestinos, o investimento em educação em saúde, são exemplos de

medidas que podem auxiliar no controle desta doença (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

A inspeção de carne é a principal medida de saúde pública praticada, (OIE, 2008). No Brasil, o Ministério da Agricultura, através do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), instituiu normas que regulam, em todo o território nacional, a inspeção de produtos de origem animal (BRASIL, 1952).

Dentre as normas estabelecidas pelo regulamento está a condenação de carcaças intensamente infectadas; rejeição parcial, em casos de carcaças com infecção discreta ou moderada, devendo estas receber tratamento por câmaras frigoríficas, por salmora da carne desossada ou por esterilização por calor. Durante a rotina de inspeção são realizadas incisões nos masseteres, pterigóideos internos e externos, palpação na língua, com incisão apenas se encontrados cistos durante a inspeção da cabeça e incisão longitudinal no coração, examinando as superfícies internas do ventrículo e das incisões (BRASIL, 1952).

Contudo, a inspeção visual apresenta baixa sensibilidade em identificar carcaças com infecção menos intensa, podendo acarretar a liberação das mesmas para o consumo humano (ONYANGO-ALBUJE et al., 1996a; WANZALA et al., 2007). Além disso, a identificação *post mortem* da infecção não reverte perdas econômicas devido à desvalorização ou condenação total das carcaças infectadas (ONYANGO-ABUJE et al., 1996a).

Diagnóstico

O diagnóstico comumente realizado para a identificação de bovinos infectados por *T. saginata* é a inspeção sanitária, utilizada como medida de controle. Porém, este diagnóstico não detecta todos os cisticercos presentes na carcaça, os quais podem se desenvolver fora dos locais definidos para a inspeção, tornando necessária a busca por novos métodos de diagnóstico

(OGUNREMI; BENJAMIN, 2010; MONTEIRO et al., 2006; WANZALA et al., 2007).

A inoculação intradérmica para a detecção da cisticercose bovina foi utilizada por muitos anos, porém, experimentos utilizando extrato antigênico total de *T. saginata* apresentavam reações falso-positivas em animais infectados por *Fasciola hepatica* e *Dicrocoelium dendriticum* (HILWIG; CRAMER, 1983), desfavorecendo seu uso como diagnóstico.

Entretanto, a reatividade cruzada com outras tênias tem sido uma característica bastante explorada para substituição da necessidade de se manter bovinos ou suínos infectados.

Hilwig e Cramer (1983) realizaram inoculação intradérmica, em bovinos com cisticercose, utilizando extratos antigênicos totais de *T. crassiceps* e de *T. saginata* e extratos antigênicos da forma adulta de *T. saginata*, constatando reatividade cruzada entre as duas espécies.

A utilização de formas metacestóides de *T. crassiceps* apresenta vantagens, devido sua fácil manutenção em laboratório através de propagação em série em camundongos, permitindo também melhor padronização da qualidade do antígeno (GEERTS et al., 1981), em relação à *T. saginata*, que necessita de bovinos, como modelos experimentais.

Devido à fácil obtenção de formas metacestóides de *T. crassiceps*, Kalinna et al. (1990) purificaram uma fração antigênica glicoprotéica de fluido vesicular dessa espécie, observando eficiente discriminação entre bovinos positivos e negativos para cisticercose, quando comparado com extrato antigênico de fluido vesicular de *T. saginata*.

Rhoads et al. (1985) realizaram ensaio imunoenzimático (ELISA) em bovinos naturalmente infectados, diagnosticados por inspeção sanitária, utilizando extratos antigênicos das formas larval e adulta de *T. saginata*, extratos antigênicos de larva de *T. crassiceps* e de fluido vesicular de *T. hydatigena*. Os melhores resultados foram obtidos com os extratos antigênicos de larva de *T. saginata* e de fluido vesicular de *T. crassiceps*, porém, ambos apresentaram reatividade cruzada com anticorpos contra *Fasciola hepatica*.

Hayunga et al. (1991) isolaram uma fração antigênica de formas metacestóides de *T. hydatigena*, denominada ThFAS e aplicaram em imunoensaio cromatográfico testando amostras de soro de bovinos infectados experimentalmente por *T. saginata*, detectando positivamente seis animais, num total de sete. Contudo, a purificação deste antígeno derivado de infecção natural é limitado pela disponibilidade de metacetódeos de *T. hydatigena*, comprometendo sua utilização como reagente (ZARLENGA et al., 1994).

Minozzo et al. (2004) verificaram similaridade nos resultados do teste ELISA entre antígenos parciais de larvas de *T. solium* e antígenos totais de *T. saginata*, refletindo elevada reatividade das estruturas constituintes do escólex, colo e pseudo-estróbilo destas espécies.

Em outro estudo, Monteiro et al. (2006) obtiveram melhor resultado utilizando antígenos de larvas de *T. solium* em teste ELISA, para detecção de bovinos infectados por *T. saginata*, em relação aos antígenos de metacestóides de *T. crassiceps*.

Contudo, o extrato antigênico de excreção/secreção de *T. saginata* apresenta performance superior à de antígenos somáticos (OGUNREMI; BENJAMIN, 2010), porém a dificuldade para se obter formas metacestóides de *T. saginata* induziu a busca por reações cruzadas entre componentes antigênicos de tenídeos de fácil obtenção (ZARLENGA et al., 1994).

Na busca por novos antígenos Zarlenga et al. (1994) realizaram a clonagem e a expressão de cDNA de *T. crassiceps* (TcA2-MBP), homólogo à fração antigênica ThFAS e observaram detecção efetiva de bovinos experimentalmente infectados por *T. saginata*.

Ferrer et al. (2003) sintetizaram peptídeos de oncosferas de *T. saginata* derivado de moléculas de superfície/excreção (HP6-2), de sequência homóloga à molécula 45S de *T. ovis* (TS45S-10) e de sequência homóloga à proteína de superfície de *Echinococcus* spp. (TEG-1) e observaram melhor sensibilidade e especificidade, em relação ao antígeno de fluido vesicular de *T. saginata* frequentemente empregado, além de mínima reação cruzada com outras espécies de helmintos.

Ferrer et al. (2007), a partir de uma biblioteca de cDNA, identificaram três moléculas de forma metacestóides de *T. solium* (Ts8B1, Ts8B2 e Ts8B3) pertencentes a uma família de proteínas antigênicas de *Taenia* spp. e *Echinococcus* spp. A molécula Ts8B2 apresentou elevada sensibilidade (96,8%) e especificidade (93,1%), quando utilizada em teste ELISA indireto para avaliação de amostras de soro de pacientes com neurocisticercose.

No entanto, os baixos níveis de anticorpos anti-*T. saginata* em bovinos com infecção menos intensa dificultam o diagnóstico sorológico (MINOZZO et al., 2004). Smith et al. (1991) avaliando bovinos experimentalmente infectados por *T. saginata* detectaram anticorpos contra *T. saginata* no período entre 50 e 60 dias após a infecção e em grupos que receberam maior dose de ovos do parasito a detecção de anticorpos iniciou 25 dias após a infecção.

Minozzo et al. (2004) realizaram infecção experimental por *T. saginata* em bovinos e, pelo teste ELISA indireto verificaram a detecção de anticorpo no período de 30 a 60 dias após a infecção, além de valores de densidade óptica menores em animais contendo apenas dois cistos calcificados em relação aos que continham maior número de cistos.

Esta relação entre número de cistos recuperados e detecção de anticorpos não foi observada por Onyango-Abuje et al. (1996b), pelo teste ELISA, em bovinos experimentalmente infectados por *T. saginata*, os quais foram detectados pela presença de anticorpos três semanas após a infecção, com pico entre 10 e 12 semanas.

Contudo, os ensaios para a detecção de anticorpos indicam exposição à infecção, não necessariamente uma infecção ativa, podendo ser úteis em estudos epidemiológicos (HARRISON et al., 1989). Entretanto, alguns antígenos, como por exemplo, os derivados de oncosferas, propiciam proteção ao hospedeiro e, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, quantidades suficientes de antígenos protetores podem ser produzidas, permitindo sua utilização no desenvolvimento de vacinas (LIGHTOWLERS et al., 2003).

Como os estudos de vacinas em bovinos apresentam elevado custo de desenvolvimento e avaliação, devido à necessidade de dissecação total da carcaça para averiguar a eficiência da vacina, a padronização de um ensaio imunoenzimático capaz de detectar antígenos (ELISA sanduíche), permitindo a identificação *ante mortem* de bovinos natural e experimentalmente infectados, pode ser útil para o monitoramento do estatus da infecção tanto nos animais controle quanto nos animais vacinados (HARRISON et al., 2005).

Harrison et al. (1989) identificaram o anticorpo monoclonal HP10, uma IgM reativa com glicoproteínas de superfície/secreção de formas metacestóides de *T. saginata*, o qual apresentou baixa reatividade cruzada com *T. hydatigena*, *Echinococcus granulosus* e *Fasciola gigantica*.

Onyango-Abuje et al. (1996b), aplicaram o teste ELISA sanduíche, com o anticorpo monoclonal HP10, em bovinos, no Kenia, natural e experimentalmente infectados e não detectaram animais com menos de 14 cisticercos vivos.

Brand et al. (1992) identificaram um anticorpo monoclonal (12G5) específico para excreção/secreção de formas metacestóides de *T. saginata* que apresentou bons resultados na identificação de bovinos infectados com pelo menos 88 cistos viáveis, além de apresentar reação cruzada apenas com outros cestódeos, como *E. granulosus*, *T. hydatigena* e *T. ovis*.

Outro anticorpo monoclonal (B₁₅₈C₁₁A₁₀), uma IgG reativa com produtos de excreção/secreção de formas metacestóides de *T. saginata*, foi utilizada em ELISA sanduíche por Dorny et al. (2000) em amostras de soro de bovinos naturalmente infectados, resultando em elevados valores de sensibilidade e especificidade, em animais infectados e com mais de 50 cisticercos vivos.

Wanzala et al. (2007) realizaram teste ELISA sanduíche, com o anticorpo monoclonal HP10, em amostras de bovinos natural e experimentalmente infectados, observando valores de sensibilidade de 80% em animais naturalmente infectados, com dois a vinte e dois cisticercos vivos e de 60% em animais experimentalmente infectados, contendo entre 14 a 193 cisticercos viáveis.

Portanto, é necessário que as condições dos testes sejam consideradas, como o tipo de extrato antigênico e a intensidade da infecção, que podem interferir nos resultados de diagnóstico tanto para a detecção de anticorpos quanto de antígenos.

Objetivo

Devido aos testes sorológicos apresentarem maior sensibilidade em relação ao método comumente utilizado, a inspeção sanitária de carcaças, o presente trabalho objetivou contribuir para o controle do complexo teníase-cisticercose, avaliando as características diagnósticas dos testes ELISA indireto, realizado com três extratos antigênicos diferentes e ELISA sanduíche, realizado com o anticorpo monoclonal HP10, relacionando-as com a intensidade da infecção dos bovinos por *Taenia saginata*.

REFERÊNCIAS

BRANDT, J. R. A.; GEERTS, S.; DE DEKEN, R.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; BRIJS, L.; FALLA, M. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 22, p. 471-477, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília:Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 241p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf. Acesso em: 11 de julho de 2011.

DORNY, P.; VERCAMMEN, F.; BRANDT, J.; VANSTEENKIST, W.; BERKVEN, D.; GEERTS, S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 43-49, 2000.

FERRER, E.; BONAY, P.; FOSTER-CUEVAS, M.; GONZÁLEZ, L. M.; DÁVILA, I.; CORTÉZ, M. M.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; GÁRATE, T. Molecular cloning and characterization of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8kDa diagnostic antigen family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, p. 90-100, 2003.

FERRER, E.; GONZÁLEZ, L. M.; MARTÍNEZ-ESCRIBANO, J. A.; GONZÁLEZ-BARDERAS, M. E.; CORTÉZ, M. M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; GÁRATE, T. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein for the diagnosis of cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 101, p.517-525, 2007.

FUKUDA, R. T.; PRATA, L. F.; VERARDINO, H.; ALMEIDA, L. A. M. Evolução da cisticercose bovina em animais abatidos no Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 17, p. 21-31, 2003.

GEERTS, S.; KUMAR, V.; AERTS, N.; CEULEMANS, F. Comparative evaluation of immunoelectrophoresis, counterimmunoelectrophoresis and enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 8, p. 299-307, 1981.

HARRISON, L. J. S.; JOSHUA, G. W. P.; WRIGHT, S. H.; PARKHOUSE, R. M. E. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. **Parasite Immunology**, v.11, p.351-370, 1989.

HARRISON, L. J. S.; GARATE, T.; BRYCE, D. M.; GONZALEZ, L. M.; FOSTER-CUEVAS, M.; WAMAE, L. W.; ONYANGO-ABUJE, J. A.; PARKHOUSE, R. M. E. Ag-ELISA and PCR for monitoring the vaccination of cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncospherical adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, p. 103-120, 2005.

HAYUNGA, E. G.; WONG, M. M.; SUMNER, M. P.; ISENSTEIN, R. S. Evaluation of a "dipstick" immunoassay to detect cysticercosis in experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 38, p. 13-22, 1991.

HILWIG, R. W.; CRAMER, J. D. In vivo cross-reactivity of *Taenia saginata* and *Taenia crassiceps* in bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 12, p. 155-164, 1983.

KALINNA, B.; GEYER, E.; WALTHER, M. Purification of an antigen from the *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid highly sensitive in detecting IgG-antibodies (ELISA) in calves with experimental cysticercosis. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 37, p. 213-221, 1990.

LIGHTOWLERS, M. W.; GAUCI, C. G.; CHOW, C.; DREW, D. R.; GAUCI, S. M.; HEATH, D. D.; JACKSON, D. C.; DADLEY-MOORE, D. L.; READ, A. J. Molecular and genetic characterization of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestod parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1207-1217, 2003.

MINOZZO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLORTEGUI, C. C.; SOARES, V. E.; COSTA, A. J. Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra-*Cysticercus bovis*. **Ciência Rural**, v. 34, p. 857-864, 2004.

MINOZZO, J. C.; GUSSO, R. L. F.; CASTRO, E. A.; LAGO, O.; THOMAZ-SOCCOL, V. Experimental bovine infection with *Taenia saginata* eggs: recovery rates and cysticerci location. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 451- 455, 2002.

MONTEIRO, L.L.; PINTO, P. S. A.; DIAS, F. S. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 260-263, 2006.

OGUNREMI, O.; BENJAMIN, J. Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 93-101, 2010.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOTIES. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 2008, v. 1-2. p.1343. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/>. Acesso em 11 de julho de 2011.

ONYANGO-ABUJE, J. A.; HUGHES, G.; OPICHA, M.; NGINYI, K. M.; RUGUTT, M. K.; WRIGHT, S. H.; HARRISON, L. J. S. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 221-230, 1996b.

ONYANGO-ABUJE, J. A.; NGINYI, J. M.; RUGUTT, M. K.; WRIGHT, S. H.; LUMUMBA, P.; HUGHES, G.; HARRISON, L. J. S. Seroepidemiological survey of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenya. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p.177-185, 1996a.

PFUETZENREITER, M. R.; ÁVILA-PIRES, F. D. Epidemiologia da Teníase/Cisticercose por *T. solium* e *T. saginata*. **Ciência Rural**, v. 30, p. 541-548, 2000.

RHOADS, M. L.; MURRELL, K. D.; DDILLING, G. W.; WONG, M. M.; BAKER, N. F. A potencial diagnostic reagent for bovine cysticercosis. **The Journal of Parasitology**, v. 6, p. 779-787, 1985.

SILVA, A. M. Teníase e cisticercose. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10ª ed. Ribeirão Preto: Atheneu, 2003. Cap. 25, p. 227-238.

SMITH, H. J.; SNOWDON, K. E.; FINLAY, R. C. Serological diagnosis of cysticercosis by an enzyme-linked immunosorbent assay in experimentally infected cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 274-276, 1991.

SOUZA, R. M.; ANTUNES, C. F.; GUATIMOSIN, C. B.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, A. L.; SANTOS, W. L. M. A importância do Serviço de Inspeção Federal na vigilância sanitária de alimentos : cisticercose bovina. **Higiene Alimentar**, v. 11, p. 19-21, 1997.

WANZALA, W.; KYULE, N. M.; ZESSIN, K. H.; ONYANGO-ABUJE, A. J.; KANG'ETHE, K. E.; OCHANDA, H.; HARRISON, L. J. S. Evaluation of an antigen-ELISA in the diagnosis of bovine cysticercosis in Kenyan cattle. **Parasitology Research**, v. 100, p.539-548, 2007.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Teniasis/Cysticercosis**. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/diseases/taeniasis/en>. Acesso em: 11 de julho de 2011.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Training manual on diagnosis of intestinal parasites**. Geneva. 2004. 48 p. Disponível em: <http://www.who.int/wormcontrol/documents/benchaid/en/trainingmanual_sip98-2.pdf>. Acesso em: 19 de junho de 2010.

ZARLENGA, D. S.; RHOADS, M. L.; AL-YAMAN, F. M. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 67, p. 215-223, 1994.

CAPÍTULO 2 – COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA

Comparação de diferentes ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico da cisticercose bovina

RESUMO - A cisticercose bovina, causada pela forma metacestóide de *Taenia saginata*, é responsável por prejuízos econômicos devido à desvalorização de carcaças infectadas. A inspeção sanitária tem sido a principal forma de diagnóstico desta zoonose, porém apresenta baixa sensibilidade em identificar animais com infecção menos intensa. Ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos e de antígenos representam importante alternativa de diagnóstico *ante mortem* para a identificação de animais infectados. Neste trabalho avaliou-se a detecção de anticorpos anti-*Taenia saginata* por ELISA indireto e de antígenos de *T. saginata* pelo teste ELISA sanduíche em 100 amostras de soro de bovinos naturalmente infectados. A detecção de anticorpos apresentou maior sensibilidade comparada à detecção de antígeno, mesmo em condições de infecção menos intensa, porém, as melhores características diagnósticas dos testes foram observadas quando se avaliaram amostras de animais com infecções mais intensas.

Palavras-chave: anticorpos monoclonais, antígeno de excreção/secreção, antígeno de fluido vesicular, ELISA, inspeção sanitária, *Taenia saginata*

Introdução

A cisticercose bovina é causada por formas metacestóides de *Taenia saginata* e apresenta distribuição cosmopolita. Embora seja um problema de saúde pública devido à teníase humana, sua principal importância é econômica, pela condenação ou desvalorização de carcaças infectadas (FERRER et al., 2003; OIE, 2008). No Brasil a prevalência desta zoonose varia de 0,7 a 5,3% de acordo com a região avaliada (UNGAR; GEMANO, 1992).

O diagnóstico da cisticercose bovina baseia-se na inspeção de carcaças durante o abate realizado em frigoríficos, como medida de controle do complexo teníase-cisticercose, porém, apresenta baixa sensibilidade (SMITH et al., 1991; WANZALA et al., 2007).

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico *ante mortem* pode ser útil na seleção de animais para tratamento, na avaliação dos efeitos dos programas de controle ou mesmo em conjunto com a inspeção sanitária (PARKHOUSE; HARRISON, 1987; SMITH et al., 1991). Além disto, estudos para desenvolvimento e monitoramento da efetividade de vacinas contra cisticercose bovina requerem o auxílio de técnicas de diagnóstico sorológico (HARRISON et al., 2005).

Com o propósito de se obter um teste mais sensível e específico para o diagnóstico da cisticercose, antígenos homólogos e heterólogos têm sido identificados e avaliados. Extratos antigênicos de fluido vesicular de *Taenia hydatigena* (SMITH et al., 1991), de *T. solium*, de *T. crassiceps* (MONTEIRO et al., 2006) e de *T. saginata* (FERRER et al., 2003), antígenos totais de *T. solium* e de *T. crassiceps* (PINTO et al., 2006), de excreção/secreção de *T. saginata* (OGUNREMI; BENJAMIN, 2010) e antígenos recombinantes (FERRER et al., 2007) tem sido avaliados para a detecção de anticorpos anti-*Taenia saginata* em amostras de bovinos experimental e naturalmente infectados.

Além do extrato antigênico, o diagnóstico sorológico da cisticercose bovina sofre influência de fatores como a resposta imune do hospedeiro, bem como o tempo e a intensidade de infecção (PINTO et al., 2006).

A detecção de parasitos vivos ou seus produtos por meio do teste ELISA sanduíche é útil para a identificação de bovinos com infecção ativa e resulta em maior especificidade diagnóstica em relação à inspeção de carcaças (BRANDT et al., 1992; DORNY et al., 2000; HARRISON et al., 1989; ONYANGO-ABUJE et al., 1996a). Um dos anticorpos monoclonais desenvolvidos é o HP10, uma IgM reativa com glicoproteínas de superfície/secreção de formas metacestóides de *T. saginata* (HARRISON et al., 1989).

Visto que a inspeção sanitária de carcaças, principal método diagnóstico, apresenta baixa sensibilidade, a utilização de métodos de diagnóstico sorológico com diferentes preparações antigênicas ou com anticorpo monoclonal, podem ser interessantes para a identificação de bovinos com menos intensa. Sendo assim, no presente trabalho foram realizados o teste ELISA indireto, para detecção de anticorpos anti-*T. saginata*, utilizando-se extratos antigênicos de fluido vesicular e de excreção/secreção de *T. saginata* e de fluido vesicular de *T. solium* e o teste ELISA sanduíche, com o anticorpo monoclonal HP10 para detecção de antígeno circulante de *T. saginata*, com o objetivo de se avaliar as características diagnósticas dos testes, relacionando-as com a intensidade da infecção dos bovinos por *Taenia saginata*.

Material e Métodos

Amostras biológicas

Foram colhidas formas metacestóides de *Taenia saginata* de bovinos naturalmente infectados, identificados em exame *post mortem* realizado pelos Serviços de Inspeção Federal (SIF) 385 (Andradina), 545 (Santa Fé do Sul),

337 (Lins) e 2543 (Promissão), de acordo com as normas contidas no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1952).

As formas metacestóides foram retiradas do tecido bovino, lavadas com solução salina (NaCl 0,15M) e conservadas a -20°C, em presença de inibidor de proteases (25mM PMSF), até o processamento dos antígenos.

Amostras de sangue de 200 bovinos, sendo 100 de animais com cistos vivos à inspeção sanitária (de 1 a 50 ou mais) e 100 negativas, de animais de área endêmica, também foram colhidas nos frigoríficos para obtenção da fração sérica, a qual foi conservada à -20°C até processamento.

Em cada ensaio foram incluídas, para ambos os testes ELISA, uma amostra positiva (bovino experimentalmente infectado com *T. saginata* cedida pela Dra. Edda Sciutto) e uma amostra negativa (bezerro com 60 dias de vida, de área não endêmica), como controle.

Teste ELISA indireto

O extrato antigênico de fluido vesicular de *T. saginata* foi processado de acordo com Vaz et al. (1997) e Vicentini-Oliveira et al. (2010).

Os extratos antigênicos de fluido vesicular de *T. solium* e de excreção/secreção de *T. saginata* foram processados de acordo com Harrison et al. (1989) e Larralde et al. (1986), respectivamente, e cedidos pela Dra. Edda Sciutto, do Instituto de Investigaciones Biomedicas da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

O teste ELISA indireto foi realizado segundo Ferrer et al. (2007), com algumas modificações. Foi realizada a titulação em bloco para a avaliação das melhores condições de bloqueio, diluição das amostras e do conjugado, sendo que os melhores resultados foram obtidos com leite em pó desnatado 5% como solução de bloqueio, amostras diluídas 1:400 e anti-IgG bovina ligada à peroxidase, como conjugado.

Microplacas MaxiSorp (Nunc-Immuno™ Plates) sensibilizadas com os extratos antigênicos (10µg/mL) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6), a 4°C, por 18 horas. Para o bloqueio das microplacas foi utilizado leite em pó desnatado 5% (Nestlé® - Svelty) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6), a 4°C, por 2 horas.

O teste foi realizado em duplicata, com amostras de soro bovino diluídas 1:100, em solução fosfato (PBS 0,01M, pH 7,2, Tween 20® 0,05%) acrescido de leite em pó desnatado 5% (Svelty - Nestlé®), seguido de incubação por 1 hora, a 37°C. O conjugado utilizado foi anti-IgG bovina produzida em coelho, ligada à peroxidase (Sigma® - A5295), diluído 1:8000 em PBS/Tween20® 0,05%/leite em pó 5% (Svelty - Nestlé®), com incubação a 37°C, por 1 hora.

A lavagem das microplacas foi feita com PBS/Tween 20® 0,05%, por 3 vezes, por 3 minutos cada, entre cada etapa do imunoensaio.

Como solução cromógena foi utilizado 3, 3', 5, 5' tetramethyl benzidine (TMB) em tampão citrato-fosfato (pH 5,0) (Invitrogen® - cat.00-2023) e a reação foi interrompida com 3N HCl, após 20 minutos. A leitura das microplacas foi feita em fotômetro Multiskan EX (Labsystems®) em comprimento de 450nm.

Teste ELISA sanduíche

O teste ELISA sanduíche foi realizado de acordo com Harrison et al. (1989), utilizando-se o anticorpo monoclonal HP10 para a captura, e o mesmo anticorpo monoclonal biotilado, para a detecção do sistema (HARRISON et al., 1989), cedidos pelo Dr. Robert M. E. Parkhouse, do Instituto Gulbenkian de Ciências, Portugal.

Microplacas MaxiSorp (Nunc-Immuno™ Plates) foram sensibilizadas com o anticorpo monoclonal (10µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6), a 4°C, por 18 horas. Para o bloqueio das microplacas foi utilizada soro albumina bovina 1% (BSA) (Sigma – A7906)

diluída em tampão fosfato (PBS, 0,01M, pH 7,2), com incubação a 37°C, por 1 hora.

Amostras de soro de bovinos não diluídas foram adicionadas, em duplicata e incubadas por 1 hora, a 37°C. Em seguida, adicionou-se anticorpo monoclonal HP10 biotinilado diluído 1:1.000 em PBS (0,01M, pH 7,2), incubando-se por 1 hora, a 37°C. Como sistema de detecção foi utilizada a estreptavidina ligada a peroxidase (Sigma® – S2438), diluída 1:40.000 em PBS (0,01M, pH 7,2) e incubada por 1 hora, a 37°C.

A lavagem das microplacas foi feita com PBS/Tween 20® 0,05%, por 4 vezes, por 3 minutos cada, entre cada etapa do imunoenensaio, exceto após a incubação com o anticorpo monoclonal biotinilado e antes da adição da solução cromógena, onde a lavagem foi feita realizada 4 vezes, por 5 minutos cada.

Como solução cromógena utilizou-se 3, 3', 5, 5' tetramethyl benzidine (TMB) em tampão citrato-fosfato, pH 5,0 (Invitrogen® - cat. n. 00-2023) e a reação foi interrompida com H₂SO₄ 0,2M, após 15 minutos. A leitura das microplacas foi feita em fotômetro Multiskan EX (Labsystems®) em comprimento de 450nm.

Análise estatística

Os valores de densidade óptica (D. O.) foram padronizados, para ambos os testes ELISA indireto e sanduíche, segundo a fórmula:

$$A/P = \frac{\text{média D.O. da amostra} - \text{média D.O. controle negativo}}{\text{média D.O. contole positivo} - \text{média D.O. controle negativo}}$$

O estabelecimento do ponto de corte para cada ensaio foi realizado pela curva “Receiver Operating Characteristic” (ROC), com auxílio do programa GraphPad® Prism4. Considerou-se também a área abaixo da curva ROC (AAC), que fornece a probabilidade média de um animal infectado apresentar

valores do teste maiores que um animal não infectado (GARDNER et al., 2010).

Como medida de qualidade do ensaio foi calculado o coeficiente de variação dos valores de D.O. entre placas, referentes a uma amostra de soro de bovino experimentalmente infectado. Foram ainda calculados o coeficiente Kappa e o coeficiente de correlação de Pierson para a avaliação da concordância, bem como a análise de variância (ANOVA) para avaliação da intensidade de associação entre os diferentes testes ELISA, por meio do programa BioEstat[®] 5.0.

Resultados

Considerando-se as 200 amostras avaliadas, a detecção de anticorpos contra *T. saginata* por ELISA indireto apresentou melhor resultado utilizando-se o extrato de fluido vesicular de *T. solium*, com sensibilidade de 69% e especificidade de 68% (Tabela 1 e Figura 1). Embora os ensaios com extrato antigênico de fluido vesicular de *T. saginata* tenham apresentado sensibilidade de 67%, a especificidade foi menor (52%).

Em todos os testes a área abaixo da curva ROC apresentou valores próximos ao limite que indica baixa probabilidade de bovinos infectados por *T. saginata* apresentarem valores de D.O. maiores que bovinos não infectados (Tabela 1, Figura 2). Observou-se maior coeficiente de variação entre ensaios do teste ELISA sanduíche, possivelmente por incluir uma etapa a mais em seu processamento, aumentando o risco de erros durante os procedimentos.

Tabela 1 - Sensibilidade e especificidade dos testes ELISA indireto com antígenos de fluido vesicular (FV) de *T. solium* e *T. saginata* e de excreção/secreção (E/S) de *T. saginata*; ELISA sanduíche (anticorpo monoclonal HP10), utilizando-se 100 amostras de soro de bovino negativas e 100 com cistos vivos, diagnosticados por inspeção sanitária

	FV <i>T. solium</i>	FV <i>T. saginata</i>	E/S <i>T. saginata</i>	HP10
Ponto de corte	0,233	0,265	0,705	0,039
Área abaixo da Curva	0,693	0,575	0,544	0,555
Sensibilidade %	69,0	67,0	61,0	61,0
Especificidade %	68,0	52,0	51,0	56,0
Coefficiente de Variação %	4,3	4,1	12,9	28,0

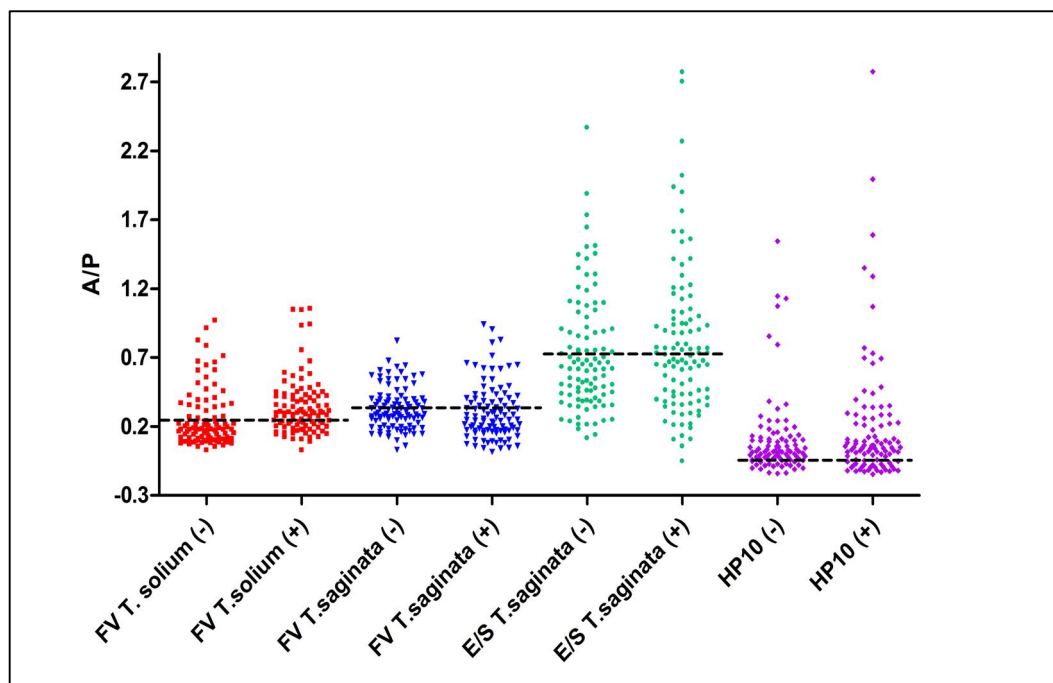


FIGURA 1—Média dos valores de densidade óptica padronizados (A/P) ao teste ELISA indireto com antígeno de fluido vesicular (FV) de *T. solium* e *T. saginata*, de excreção/secreção (E/S) de *T. saginata* e ao teste ELISA sanduíche (HP10), utilizando-se amostras de soro de bovinos negativos e naturalmente infectados, diagnosticados por inspeção sanitária. As linhas pontilhadas referem-se aos pontos de corte.

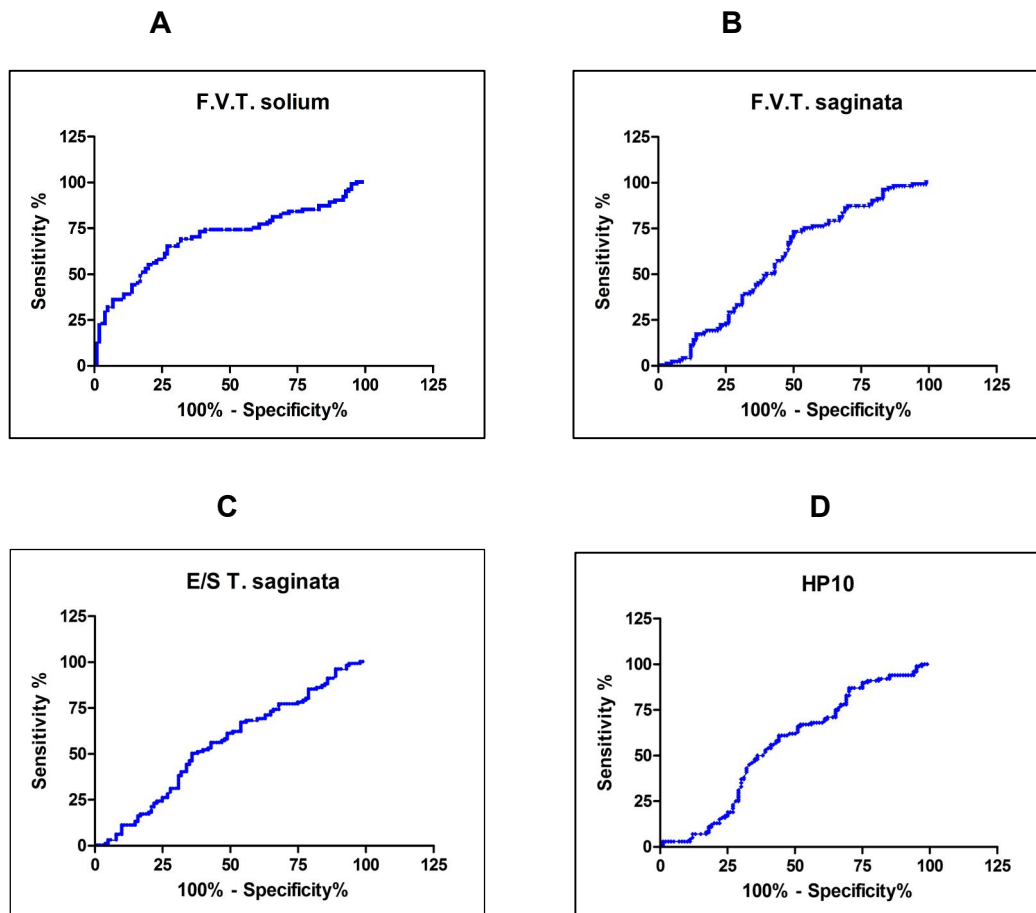


Figura 2—Curva ROC para os resultados do teste ELISA indireto com extrato antigênico de fluido vesicular de *Taenia solium* (A), com o extrato antigênico de fluido vesicular de *Taenia saginata* (B); com o extrato antigênico de excreção/secreção de *Taenia saginata* (C); resultados do teste ELISA sanduíche utilizando o anticorpo monoclonal HP10 (D).

Como a maioria das amostras positivas utilizadas neste trabalho era de animais com infecção menos intensa (de até dois cistos vivos) e devido a dificuldade de se obter amostras de bovinos intensamente infectados, foi realizada a análise estatística utilizando-se somente as cinco amostras de soro de animais com infecção mais intensa (50 cistos ou mais).

Nestas condições, todos os ensaios apresentaram maiores valores de sensibilidade e de especificidade e os melhores resultados para a detecção de anticorpos foram observados com os antígenos de fluido vesicular e de excreção/secreção de *T. saginata* (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2 – Sensibilidade e especificidade dos testes ELISA indireto com antígenos de fluido vesicular (FV) de *T. solium* e *T. saginata* e de excreção/secreção (E/S) de *T. saginata*; ELISA sanduíche (anticorpo monoclonal HP10), utilizando-se 100 amostras de soro de bovino negativas e cinco com infecção intensa, diagnosticadas por inspeção sanitária

	FV <i>T.</i> <i>solium</i>	FV <i>T.</i> <i>saginata</i>	E/S <i>T.</i> <i>saginata</i>	HP10
Ponto de corte	0,528	0,615	1,560	0,135
Área abaixo da Curva	0,872	0,834	0,794	0,900
Sensibilidade %	89,0	96,0	96,0	80,0
Especificidade %	60,0	80,0	80,0	80,0
Coeficiente de Variação %	2,8	5,2	11,2	33,2

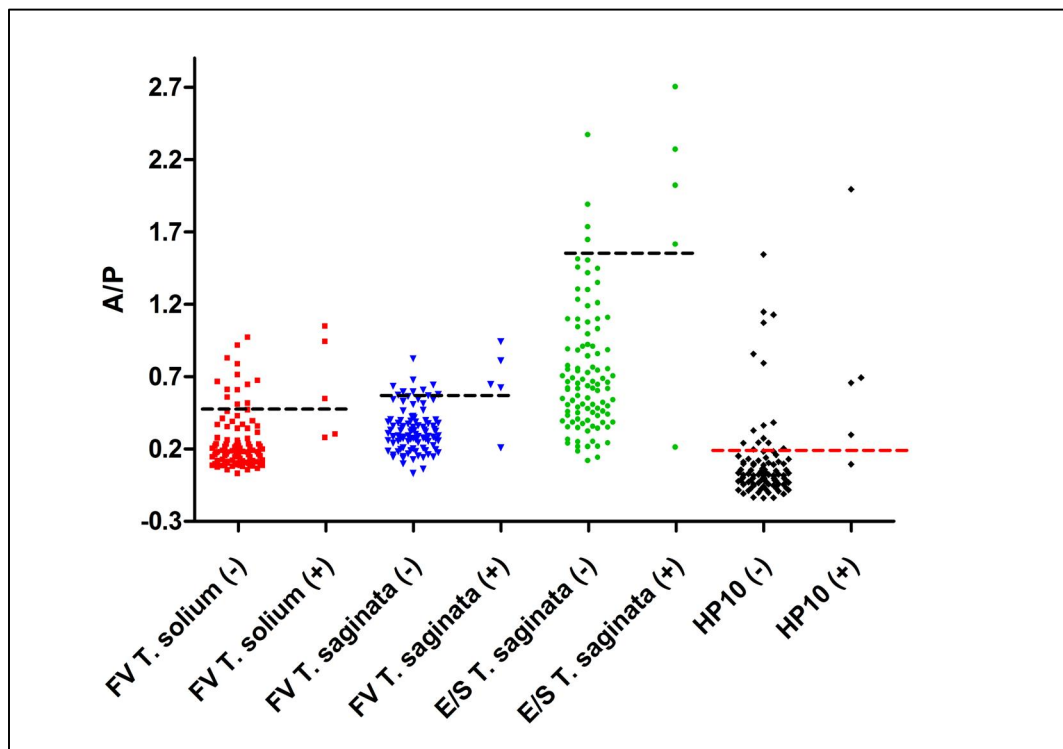


FIGURA 3- Média dos valores de densidade óptica padronizados (A/P) ao teste ELISA indireto com antígenos de fluido vesicular (FV) de *T. solium* e *T. saginata* e de excreção/secreção (E/S) de *T. saginata* e ao teste ELISA sanduíche (HP10), utilizando-se amostras de soro de bovinos negativos e com infecção mais intensa. As linhas pontilhadas referem-se aos valores de ponto de corte.

Embora a especificidade do teste ELISA indireto com os antígenos de fluido vesicular e de excreção/secreção de *T. saginata* e do teste ELISA sanduíche tenha sido igual (80%), analisando-se a área abaixo da curva ROC (Tabela 2 e Figura 4) o teste ELISA sanduíche obteve resultado próximo ao ideal (AAC = 1,0).

A análise de variância (ANOVA) revelou que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre os pontos de corte dos testes ELISA indireto realizados com diferentes extratos antigênicos bem como entre estes e o teste ELISA sanduíche, à exceção do teste ELISA indireto realizado

com extrato antigênico de fluido vesicular de *T. solium* e o realizado com extrato antigênico de fluido vesicular de *T. saginata*. Embora tenha havido diferença entre os pontos de corte do teste ELISA indireto com extrato antigênico de fluido vesicular e de excreção/secreção de *T. saginata*, observou-se boa concordância ($Kappa=0,418$; $p<0,0001$) e intensa associação ($r=0,727$; $p<0,0001$) entre estes.

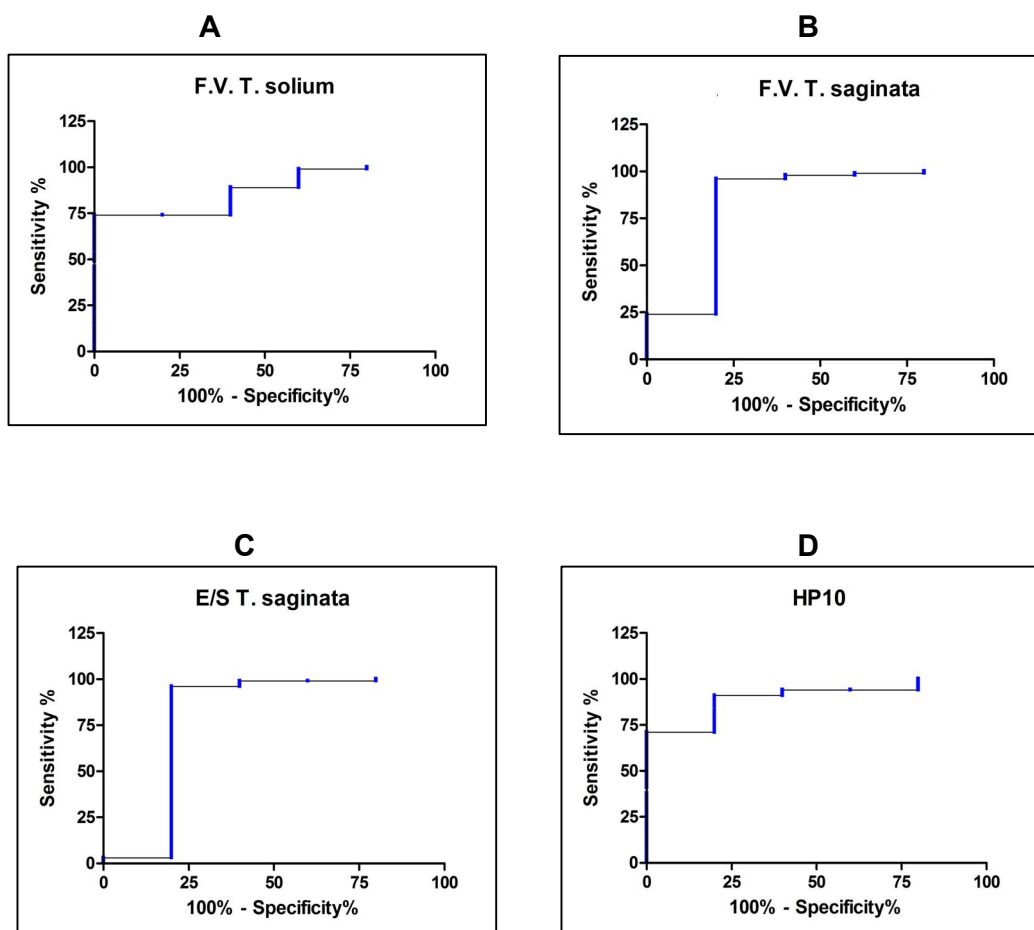


FIGURA 4—Curva ROC para os resultados do teste ELISA indireto com extrato antigênico de fluido vesicular de *Taenia solium* (A), com o extrato antigênico de fluido vesicular de *Taenia saginata* (B); com o extrato antigênico de excreção/secreção de *Taenia saginata* (C); resultados do teste ELISA sanduíche utilizando o anticorpo monoclonal HP10 (D), em amostras de bovinos com infecção intensa.

Discussão

Na presente pesquisa o uso de testes sorológicos em animais naturalmente infectados por *T. saginata*, como o ELISA indireto para detecção de anticorpos e ELISA sanduíche para a detecção de antígeno circulante resultou na identificação *ante mortem* de bovinos infectados.

Para animais com presença de um a dois cistos vivos à inspeção sanitária o teste ELISA indireto apresentou maior sensibilidade e especificidade quando da utilização do antígeno de fluido vesicular de *T. solium*. Quando se utilizou o antígeno de excreção/secreção de *T. saginata*, a sensibilidade foi menor (61%) que a observada por Ogunremi e Benjamin (2010) (92,9%). Embora o extrato antigênico seja semelhante, algumas condições do teste como o tratamento das amostras de soro por calor para promoção da dissociação de imunocomplexos e a utilização de animais experimentalmente infectados, que geralmente albergam número mais elevado de cistos, podem ter influenciado nos resultados.

Os testes para detecção de anticorpos anti-*T. saginata* apresentaram melhores resultados quando comparados com a detecção de antígeno circulante, mesmo em condições de infecção menos intensa, possivelmente pela menor sensibilidade da técnica de ELISA sanduíche, já que as amostras avaliadas eram de bovinos com cistos vivos, portanto passíveis de terem antígeno circulante.

A comparação do teste ELISA indireto com diferentes extratos antigênicos revelou sensibilidade semelhante para a detecção de anticorpos anti-*T. saginata*, embora tenha havido correlação estatisticamente significativa apenas quando se comparou a utilização de antígeno de fluido vesicular com antígeno de excreção/secreção de *T. saginata*.

Os resultados observados nesta pesquisa indicam que a intensidade da infecção é um dos fatores que mais influenciam a identificação sorológica de bovinos infectados por *T. saginata*, uma vez que houve aumento nos valores de sensibilidade e especificidade, tanto quando da detecção de anticorpos anti-

T. saginata como de antígeno circulante deste parasita, quando se considerou animais com infecção mais intensa. Harrison et al. (1989) observou detecção de antígeno, circulante com o mesmo anticorpo monoclonal HP10 apenas em bovinos que apresentaram pelo menos 200 cisticercos vivos, após infecção experimental. Brandt et al. (1992) utilizando ELISA sanduíche com anticorpo monoclonal contra antígenos de excreção/secreção de *T. saginata*, também detectaram antígeno circulante apenas em bovinos com mais de 50 cistos vivos. Onyango-Abuje et al. (1996b) testando soro de animais naturalmente infectados por ELISA sanduíche com anticorpo monoclonal HP10 também observaram valores de sensibilidade de 83% em amostras de soro de bovinos que continham no mínimo 30 cistos e de 22% para os bovinos que apresentaram entre um e vinte e nove cistos.

A concordância de resultados positivos e negativos entre os testes ELISA indireto e ELISA sanduíche (34%) foi superior a observada por Onyango-Abuje et al. (1996a) (3,1%), que também utilizaram anticorpo monoclonal HP10 e antígeno de fluido vesicular de *T. saginata*. Ainda que as condições de infecção tenham sido semelhantes, a origem das amostras (Quênia), a ocorrência de coinfeção por outros parasitas (*Echinococcus granulosus*, *Fasciola gigantica*) e o tamanho maior da amostra (1184) no avaliadas por estes autores podem ter influenciado para o baixo coeficiente de concordância resultante.

As características diagnósticas do teste ELISA indireto realizado com os três extratos antigênicos diferentes e do teste ELISA sanduíche, com o anticorpo monoclonal HP10 observa-se que apesar da detecção de anticorpos anti-*T. saginata* ter sido superior à detecção de antígeno circulante do parasita, todos os testes apresentaram melhor desempenho em condições de infecção mais intensa, indicando que o diagnóstico sorológico da cisticercose bovina ainda apresenta limitações para seu uso nestas condições de infecções menos intensas.

Conclusão

A detecção de anticorpos anti-*T. saginata* utilizando-se diferentes preparações antigênicas apresentou maior sensibilidade quando comparada à detecção de antígeno circulante do mesmo parasita, porém, as melhores características diagnósticas dos testes foram observadas quando se avaliaram amostras de animais com infecção mais intensa.

AGRADECIMENTOS

Ao Pedro Luis Florindo pelo auxílio na coleta de amostras biológicas; à Dra. Edda Sciutto e equipe pelas alíquotas de extratos antigênicos de *T. solium* e *T. saginata*; ao Dr. Robert M. E. Parkhouse e equipe pelas alíquotas de anticorpo monoclonal (HP10). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

BRANDT, J. R. A.; GEERTS, S.; DE DEKEN, R.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; BRIJS, L.; FALLA, M. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 22, p. 471-477, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento 1952, 241p. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf>. Acesso em: 11 de julho de 2011.

DORNY, P.; VERCAMMEN, F.; BRANDT, J.; VANSTEENKIST, W.; BERKVEN, D.; GEERTS, S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 43-49, 2000.

FERRER, E.; BONAY, P.; FOSTER-CUEVAS, M.; GONZÁLEZ, L. M.; DÁVILA, I.; CORTÉZ, M. M.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; GÁRATE, T. Molecular cloning and characterization of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8kDa diagnostic antigen family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, p. 90-100, 2003.

FERRER, E.; GONZÁLEZ, L. M.; MARTÍNEZ-ESCRIBANO, J. A.; GONZÁLEZ-BARDERAS, M. E.; CORTÉZ, M. M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; GÁRATE, T. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein for the diagnosis of cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 101, p.517-525, 2007.

GARDNER, I. A.; GRINER, M.; DUBEY, J. P. Statistical evaluation of test accuracy studies for *Toxoplasma gondii* in food animal intermediate hosts. **Zoonosis and Public Health**, v. 57, p. 82-94, 2010.

HARRISON, L. J. S.; JOSHUA, G. W. P.; WRIGHT, S. H.; PARKHOUSE, R. M. E. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. **Parasite Immunology**, v.11, p.351-370, 1989.

HARRISON, L. J. S.; GARATE, T.; BRYCE, D. M.; GONZALEZ, L. M.; FOSTER-CUEVAS, M.; WAMAE, L. W.; ONYANGO-ABUJE, J. A.; PARKHOUSE, R. M. E. Ag-ELISA and PCR for monitoring the vaccination of

cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncospherical adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, p. 103-120, 2005.

LARRALDE, C.; LACLETTE, J. P.; OWEN, C. S.; MADRAZO, I.; SANDOVAL, M.; BOJALIL, R.; SCIUTTO, E.; CONTRERAS, L.; ARZATE, J.; DIAZ, M. L. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 5, p. 965-73, 1986.

MONTEIRO, L.L.; PINTO, P. S. A.; DIAS, F. S. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 260-263, 2006.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOTIES. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 2008, v. 1-2. p.1343. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/>. Acesso em 11 de julho de 2011.

OGUNREMI, O.; BENJAMIN, J. Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 93-101, 2010.

ONYANGO-ABUJE, J. A.; HUGHES, G.; OPICHA, M.; NGINYI, K. M.; RUGUTT, M. K.; WRIGHT, S. H.; HARRISON, L. J. S. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 221-230, 1996b.

ONYANGO-ABUJE, J. A.; NGINYI, J. M.; RUGUTT, M. K.; WRIGHT, S. H.; LUMUMBA, P.; HUGHES, G.; HARRISON, L. J. S. Seroepidemiological survey of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenya. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p.177-185, 1996a.

PARKHOUSE, R. M. E.; HARRISON, L. J. S. Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia* sp. metacestodes. **Parasite Immunology**, v. 9, p. 263-268, 1987.

PINTO, P. S. A.; MONTEIRO, L. L.; MINOZZO, J. C. A influência de diferentes grupos de soros-controle no diagnóstico da cisticercose bovina pelo teste ELISA. **Revista CERES**, v. 53, p. 574-579, 2006.

SMITH, H. J.; SNOWDON, K. E.; FINLAY, R. C. Serological diagnosis of cysticercosis by an enzyme-linked immunosorbent assay in experimentally infected cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 274-276, 1991.

UNGAR, M. L.; GERMANO, P. M. L. Prevalência da cisticercose bovina no Estado de São Paulo (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 26, p. 167-172, 1992.

VAZ, A. V.; NUNES, C. M.; PIAZZA, R. M. F.; LIVRAMENTO, J. A.; SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M.; FERREIRA, W. M. 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**, v. 57, p. 354-357, 1997.

VICENTINI-OLIVEIRA, J. C.; GOLIM, M. A.; PAULAN, S. C.; BIONDI, G. F.; ROSSI-FERREIRA, R.; DEFFUNE, E.; NUNES, C. M. *Taenia saginata*: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 621-625, 2010.

WANZALA, W.; KYULE, N. M.; ZESSIN, K. H.; ONYANGO-ABUJE, A. J.; KANG'ETHE, K. E.; OCHANDA, H.; HARRISON, L. J. S. Evaluation of an

antigen-ELISA in the diagnosis of bovine cysticercosis in Kenyan cattle.
Parasitology Research, v. 100, p.539-548, 2007.