

DETECÇÃO PELO TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA DE ANTICORPOS IgM ANTI-CYSTICERCUS CELLULOSAE NO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO NA NEUROCISTICERCOSE

*JULIA M. COSTA **

*R. MINEO **

*J. A. LIVRAMENTO ***

*M. E. CAMARGO ****

A neurocisticercose humana apresenta sintomatologia polimorfa que muitas vezes dificulta o diagnóstico clínico e na maioria dos casos o diagnóstico pode ser confundido com outras patologias, contribuindo para que os casos detectados sejam em número menor que o real. A segurança diagnóstica pela evidência do parasita em ato cirúrgico ou por exames como a tomografia computadorizada contrasta com a simplicidade dos testes imunológicos, ainda que sujeitos a limitações. Na impossibilidade de demonstração direta do parasita, os métodos imunológicos adquirem indubitável valor, uma vez que a presença de anticorpos circulantes oferece indicação indireta da infecção, mesmo antes de suas manifestações clínicas. Diversos métodos imunológicos têm sido aplicados à pesquisa de anticorpos anti-cisticerco no líquido cefalorraqueano (LCR) ^{3,4,5,11,13,14,16,17,20,23}, porém, não têm sido caracterizadas as classes de imunoglobulinas resultantes da resposta humoral. Martínez-Cairo et col.¹⁸, utilizando método de imunodifusão radial e Spina-França e Kleine²⁴ com o método da imunonefelometria demonstraram o aumento da concentração de IgG, IgM, e IgA em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose. O teste imunoenzimático "ELISA" (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) pela alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade vem sendo aplicado ao diagnóstico da cisticercose¹³ e neurocisticercose^{8,10} possibilitando a quantificação da imunoglobulina G específica.

No presente trabalho foram pesquisados anticorpos IgM anti-*C. cellulosae* em amostras de LCR, pelo teste imunoenzimático com o propósito de no futuro investigar seu significado como índice de doença em atividade. Foram comparados os níveis de anticorpos IgM e IgG detectados pelos testes imunoenzimáticos específicos. Paralelamente, compararam-se os resultados dos testes ELISA com os de hemaglutinação, imunofluorescência e fixação do complemento para neurocisticercose.

Trabalho realizado no Centro de Ciências Biomédicas do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Uberlândia * com a colaboração do Centro de Investigações em Neurologia ** e do Instituto de Medicina Tropical *** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígeno glicoproteico de Cysticercus cellulosae — Cisticercos foram obtidos a partir de músculo esquelético de suínos com infecção natural maciça. Os parasitas, separados por dissecação, resultaram em cisticercos integros que após 4 lavagens em solução salina (NaCl 0,15M) foram congelados em nitrogênio líquido e conservados a -70°C . Preparou-se o extrato glicoproteico de *C. cellulosae* segundo metodologia semelhante à descrita por Nash e col. 22. Adicionaram-se a 50 cisticercos, 10 ml de NaOH 0,2N. Após trituração por 10 minutos em homogeneizador elétrico Sorvall, seguiu-se tratamento com ultrassom por dois minutos em banho de gelo. O produto sonicado foi mantido sob agitação lenta por duas horas à temperatura ambiente. Centrifugou-se por 20 minutos a 8.500g e após desprezar o sedimento, adicionaram-se ao sobrenadante três volumes de etanol 99% gelado. A mistura foi deixada a 4°C por 24 horas. Após nova centrifugação e lavagens com etanol gelado, foram adicionados ao sedimento 10ml de água destilada e igual volume de ácido tricloroacético a 15%. Após 18 horas a 4°C o precipitado formado foi removido por centrifugação a 8.500g por 20 minutos sendo o sobrenadante cuidadosamente neutralizado com solução de NaOH, de início a 3N e depois a 0,2N e dialisado contra água destilada por 24 horas. Precipitados eventuais foram retirados por centrifugação e o material dosado pelos métodos de Antrona 19 e Lowry 15. O material foi então distribuído em alíquotas de 1ml e conservado a -70°C .

Líquido cefalorraqueano — Foram estudados 41 amostras de LCR: 26 de pacientes com neurocisticercose; 5 de pacientes com neurosífilis; 10 de pessoas aparentemente normais e que não apresentavam qualquer tipo de alteração no exame do LCR. As amostras do LCR foram centrifugadas a 2.500g e separadas em alíquotas de 1ml, sendo armazenados a -20°C .

Conjugado anti-IgM humano-peroxidase — As imunoglobulinas da classe IgM, obtidas a partir de soro de paciente com mieloma M monoclonal, foram isoladas segundo método descrito por Michele e Isliker 21 e inoculadas em carneiro. Purificou-se o antissoro obtido segundo técnica descrita por Avrameas e Ternynck 2. O antissoro específico para cadeias μ foi então marcado com peroxidase (Horseradish peroxidase, Tipo VI, Sigma Chemical Co. USA) pela técnica de Wilson e Nakane 25. O conjugado obtido foi titulado em presença de LCR reativo e não reativo para neurocisticercose. Considerou-se o título como a diluição (de razão 2) anterior à maior diluição ainda capaz de fornecer reatividade máxima para a amostra reagente e ausência da reação inespecífica para a amostra não reagente.

Teste imunoenzimático ELISA-IgM — Empregaram-se placas de polivinil (Plásticos Ampla, São Paulo, Brasil) como suporte à absorção do antígeno glicoproteico. As placas foram sensibilizadas a 4°C durante 18 horas com 0,2ml de solução de antígeno na concentração de $20\mu\text{g/ml}$, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6. Para controle, sensibilizou-se a placa somente com o tampão de diluição. Após esse período e lavagens em PBS-Tween 20 a 0,05% foram adicionadas 0,2ml das amostras de LCR não diluídas e diluídas na razão 2 e incubou-se por 45 minutos a 37°C . Após lavagens das placas com PBS-Tween, adicionou-se o conjugado no título de 1/800 e incubou-se por 45 minutos a 37°C . Após novas lavagens a reação foi revelada pela adição de 0,2ml de substrato constituído de 1,47mM de H_2O_2 e 5,23mM de ácido 5-amino-salicílico e após uma hora a temperatura ambiente procedeu-se à leitura. Esta se fazia por inspeção visual direta das placas, em comparação com LCR padrão, positivo e negativo paralelamente ensaiados. Tomava-se como título a maior diluição de LCR forne-

cendo coloração. No LCR negativo observava-se total ausência de coloração em qualquer das diluições, enquanto que muito visível e de grande intensidade nas baixas diluições dos LCR reagente. *Tratamento dos LCR com 2-mercaptoetanol* — Procedeu-se ao tratamento dos LCR positivos com 2-mercaptoetanol (2ME) para verificação da especificidade do teste quanto a detecção da imunoglobulina M. Adicionou-se a 0,2ml de LCR, 0,4ml de 2ME para solução final de 0,07M. Obteve-se LCR na diluição inicial de 1/3 e diluições seriadas na razão 2. Após uma hora a 37°C em banho maria as amostras foram analisadas pelo teste ELISA-IgM. *Teste imunoenzimático ELISA-IgG* — Procedeu-se a análise dos LCR pelo teste imunoenzimático ELISA-IgG, segundo Costa e col. 9, utilizando-se como antígeno o extrato salino total de *C. cellulosae*. *Outros testes* — Realizou-se a reação de fixação de complemento pela técnica de Koimer e col. 12 com antígeno metílico de *C. cellulosae* (Lio-Serum, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Para reação de imunofluorescência indireta utilizaram-se como antígeno cortes de 4 micra de cisticercos incluídos em Tissue Teck O.C.T. (Ames Co. Miles Laboratory, Indiana, USA) e como conjugado antiglobulina humana marcada com isotiocianato de fluoresceína pela técnica de Clark e Shepard 7. A reação de hemaglutinação com hemácias sensibilizadas com líquido de vesícula de cisticercos foi realizada como descrito por Camargo e col. 6.

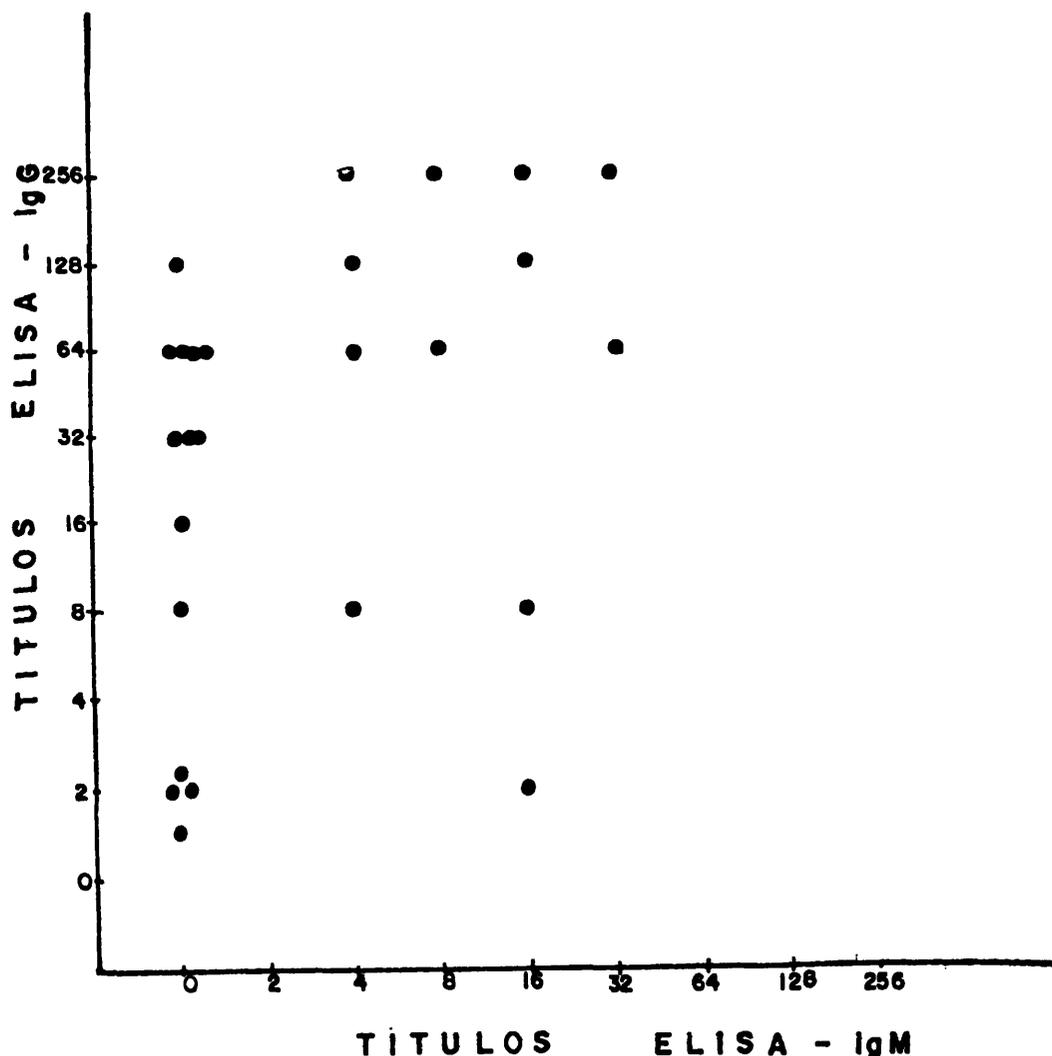


Fig. 1 — Resultados comparativos do teste ELISA-IgM e ELISA-IgG em 26 amostras de líquido cefalorraqueano de pacientes com neurocisticercose.

RESULTADOS

Determinação da concentração de polissacárides e proteínas do extrato antigênico — O extrato glicoproteico de *C. cellulosa* apresentou 640 $\mu\text{g/ml}$ de polissacárides e 216 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas. *Testes imunoenzimáticos ELISA* — Na tabela 1 são apresentados os resultados obtidos nos testes ELISA-IgM e ELISA-IgG para todas as amostras estu-

Teste	Diagnóstico					
	Neurocisticercose		Neurossífilis		Normais	
	Reag.	Não-Reag.	Reag.	Não-Reag.	Reag.	Não-Reag.
ELISA-IgM	12	14	0	5	0	10
ELISA-IgG	26	0	0	5	0	10

Tabela 1 — Resultados dos testes ELISA-IgM e ELISA-IgG anti-*C. Cellulosa* (reag., reagente; não-reag., não reagente) em 41 amostras de líquido cefalorraqueano de pacientes com neurocisticercose ou com neurosífilis e de pessoas normais.

Casos Nº	ELISA-IgM	ELISA-IgG	RHA	RIF	RFC
1	0	64	16	8	2
2	16	256	64	32	64
3	0	32	128	16	8
4	0	64	128	8	2
5	32	256	128	32	8
6	4	256	128	32	4
7	8	64	64	4	8
8	0	8	2	0	2
9	0	64	16	8	16
10	0	32	16	2	2
11	4	8	4	4	4
12	4	128	512	16	32
13	0	1	1	0	2
14	0	16	4	2	1
15	32	64	16	8	16
16	0	32	32	4	4
17	16	2	1	0	0
18	4	64	32	8	16
19	8	256	256	8	32
20	16	128	16	8	8
21	0	2	8	4	2
22	16	8	4	4	4
23	0	64	64	16	4
24	0	128	128	16	8
25	0	2	2	0	0
26	0	2	1	0	0

Tabela 2 — Títulos em 26 amostras de LCR de casos de neurocisticercose, nos testes ELISA-IgM, ELISA-IgG, hemaglutinação (RHA), imunofluorescência (RIF) e fixação do complemento (RFC).

dadas. Os níveis de anticorpos IgM e IgG anti-*C. cellulosae* nas 26 amostras de LCR com neurocisticercose estão expressas na figura 1. *Tratamento dos LCR com 2-mercaptoetanol* — Realizou-se em paralelo o teste ELISA-IgM com as amostras de LCR positivas tratadas e não tratadas, pelo 2ME, observando-se negatificação das reações para todos os LCR tratados. *Comparação dos testes imunoenzimáticos com outros testes* — Os LCR foram submetidos simultaneamente a reação de hemaglutinação, imunofluorescência e fixação do complemento para neurocisticercose. Na tabela 2 são indicados os resultados nas 26 amostras de LCR com neurocisticercose distribuídas segundo títulos nos respectivos testes. Os 5 LCR de pacientes com neurosífilis e os 10 de pessoas aparentemente normais foram negativos para todos os testes imunológicos.

COMENTARIOS

A elevada freqüência de positividade que observamos para o teste ELISA-IgM na neurocisticercose (46% de 26 casos) acentua a importância do estudo dos anticorpos IgM anti-cisticercos quanto ao seu significado para diagnóstico e acompanhamento terapêutico dessa parasitose. A alta sensibilidade do teste ELISA capaz de detectar baixos níveis de anticorpos circulantes permite a utilização de LCR sem concentrá-lo. A especificidade do teste foi comprovada pelas 12 amostras de LCR positivas que após tratamento com 2ME não mais reagiram no teste ELISA-IgM.

Os títulos dos LCR analisados pelo teste ELISA-IgM variaram de 4 a 32 e para o teste ELISA-IgG variaram de 1 a 256. Das 12 amostras de LCR que foram reagentes para os dois testes, duas apresentaram níveis de anticorpos IgM maiores que IgG. Observamos que no caso 17 pela reação de fixação do complemento e imunofluorescência as amostras eram negativas e com baixo título para hemaglutinação e ELISA-IgG. O caso 22 apresentou todas as reações positivas, mas os níveis de IgM eram maiores que os de IgG. A tabela 2 permite observar que nem sempre os testes de fixação do complemento e imunofluorescência, que são clássicos para diagnóstico pelo LCR da neurocisticercose, apresentaram-se positivos salientando-se a importância de técnicas mais sensíveis e práticas como os testes imunoenzimáticos para a determinação dos níveis de anticorpos circulantes no LCR, como referido por Costa e col.⁹

RESUMO

Demonstrou-se a presença de anticorpos da classe IgM anti-*C. cellulosae* em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose, pelo teste imunoenzimático ELISA. Este foi realizado em placas plásticas sensibilizadas com uma fração glicoproteica de cisticercos. Das 41 amostras de LCR estudadas, 26 pertenciam a pacientes com neurocisticercose, 5 a pacientes com neurosífilis e 10 a pessoas aparentemente normais. Nas 5 amostras de LCR de pacientes com neurosífilis e nas 10 de pessoas aparentemente normais foi negativo o teste ELISA-IgM. Dos 26 LCR de pacientes com neurocisticercose 12 (46,2%) apresentaram anticorpos IgM anti-*C. cellulosae* com títulos que variaram de 4

a 32. Essas 12 amostras de LCR quando submetidas ao tratamento com 2-mercaptoetanol tornaram-se negativas no teste ELISA-IgM. Compararam-se os níveis de anticorpos IgM e IgG anti-*C. cellulosa* detectados pelos respectivos testes imunoenzimáticos para todas as amostras estudadas e observou-se que, dos 12 LCR de pacientes com neurocisticercose reagentes pelos dois testes, dois apresentaram níveis de IgM mais elevados que de IgG. Paralelamente compararam-se os resultados dos testes ELISA com as reações de fixação do complemento, imunofluorescência e hemaglutinação para neurocisticercose.

SUMMARY

Cerebrospinal fluid IgM antibodies against Cysticercus cellulosa detection in neurocysticercosis through ELISA immunoenzymatic assay.

IgM antibodies against *Cysticercus cellulosa* in the cerebrospinal fluid (CSF) was demonstrated by ELISA immunoenzymatic assay in neurocysticercosis. CSF samples of 41 patients were analyzed for this purpose. Diagnosis was neurocysticercosis in 26 and neurosyphilis in 5; abnormalities were not registered in the other 10 cases. Neurosyphilis samples and no-abnormalities samples were considered as control groups. ELISA IgM assay for cysticercosis was negative in all CSF samples of control groups and it was positive in 12 of the 26 CSF samples of the neurocysticercosis group (46.2%) Titers ranged from 4 till 32. Positive results were no more obtained after previous treatment of CSF samples by 2-mercaptoetanol. ELISA IgM and IgG titers were compared. IgM titers were higher than IgG titers in two cases. Results obtained were compared to those found through complement fixation, immunofluorescence and hemagglutination tests for the diagnosis of neurocysticercosis.

REFERÊNCIAS

1. ARAMBULO III, P.V.; WALLS, K.W.; BULLOCK, S. & KAGAN, I.G. -- Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immuno specific assay (ELISA). *Acta tropica* 35:63, 1978.
2. AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. — The cross linked of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* 6:53, 1969.
3. BASSI, G.E.; CAMARGO, M.E.; BITTENCOURT, J.M.T. & GUARNIERE, D.B. — Reação de imunofluorescência com antígenos de *Cysticercus cellulosa* no líquido cefalorraqueano. *Neurobiologia* 42:165, 1979.
4. BIAGI, F.F.; NAVARRETE, F.; PIÑA, A.; SANTIAGO, A.M. & TAPIAL, L. — Estudio de tres reacciones serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis. *Rev. med. Hosp. General (México)* 11-12:501, 1961.
5. BIAGI, F.F. & TAY, J.A. — A precipitation reaction for the diagnostic of cysticercosis. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 7:63, 1958.
6. CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S. & SIQUEIRA, G.R.U. — Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:81, 1973.
7. CLARK, H.F. & SHEPARD, C.C. — A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. *Virology* 20:642, 1963.
8. COSTA, J.M. — Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. Tese. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

9. COSTA, J.M.; FERREIRA, A.W.; MAKINO, M.M. & CAMARGO, M.E. — Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 24:337, 1982.
10. DIWAN, A.R.; COKER-VANN, M.; BROWN, P.; SUBLIANTO, D.B.; YOLKEN, R.; DESOWITZ, R.; ESCOBAR, A.; GIBBS Jr.; C.J. & GAJDUSEK, D.C. — Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 31:364, 1982.
11. GRISOLIA, J.S. & WIEDERHOLT, W.C. — CNS cysticercosis. *Arch. Neurol.* 39:540, 1982.
12. KOLMER, J.A.; SPAULDING, E.M. & ROBINSON, H.W. — Approved Laboratory Technic. Ed.5. Appleton Century Crofts, New York, 1951, pg. 797.
13. LANGE, O. — Síndrome líquórica da cisticercose encefalomeningea. *Rev. Neurol. Psiquiat. São Paulo* 6:35, 1940.
14. LIVRAMENTO, J.A. — Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 39:261, 1981.
15. LOWRY, V.H.; ROSEMBROUCH, N.J.; FARR, A.L. & RANDAL, R.J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193:265, 1956.
16. MACHADO, A.J.; CAMARGO, M.E. & HOSHINO, S. — Reação de imunofluorescência para cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas a lâminas de microscopia. *Rev. Soc. bras. Med. trop.* 7:181, 1973.
17. MARTÍNEZ, B. — Diagnóstico serológico de la cisticercosis. *Prensa med. mex.* 28:26, 1963.
18. MARTÍNEZ-CAIRO, S.; RUIZ-MACIAS, C.; LOPES-ROMAN, M. & MATEOS-GOMEZ, H. — Usefulness of concentrated CSF hemagglutination technique for the diagnosis of cerebral cysticercosis. *Arch. invest. médica (Mexico)* 11:347, 1980.
19. MARTIRANI, I.; HOXTER, G.; WAJCHENBERG, B.L.; MARIANI, I. & CINTRA, A.B.U. — Determination of polysaccharide hexoses and hexosamines in normal human sera. *J. Lab. clin. Med.* 54:773, 1959.
20. McCORMICK, G.F.; ZEE, C.S. & HEIDEN, J. — Cysticercosis cerebri: review of 127 cases. *Arch. Neurol.* 39:534, 1982.
21. MICHELI, A. & ISLIKER, H. — Cleavage of gamma-M-globulin by means of reducing enzyme systems. *Immunochemistry* 3:385, 1966.
22. NASH, T.E.; PRESCOTT, B. & NEVA, F.A. — The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. *J. Immunol.* 112:1500, 1974.
23. REIS, J.B.; BEI, A. & REIS FILHO, J.B. — Nossa experiência com a reação de fixação de complemento pela técnica de Wadsworth, Maltaner e Maltaner adaptada ao líquido cefalorraqueano para o diagnóstico da sífilis e da cisticercose. *Rev. paul. Med.* 62:118, 1963.
24. SPINA-FRANÇA, A. & KLEINE, T.O. — Clinical validity of IgG, IgM, IgA and agarose gel electrophoresis of proteins in CSF in diagnosing neurocysticercosis. In: E. Levy (ed.): *Advances in Pathology*. Pergamon Press, Oxford, 1982, pg. 519.
25. WILSON, M.B.; NAKANE, P.K. — Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In W. Knapp, K. Holubar & G. Wick (eds.): *Imunofluorescence and Related Techniques*. North-Holland Biomedical, Amsterdam, 1978, pg. 215.