

TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) NO DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE

ESTUDO DE DIFERENTES EXTRATOS ANTIGÊNICOS NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG EM AMOSTRAS DE SORO E DE LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO

JULIA MARIA COSTA *

Os métodos imunológicos alcançam quase sempre papel central no diagnóstico da neurocisticercose em que a detecção de anticorpos para antígenos do *Cysticercus cellulosae*, em amostras de soro ou de líquido cefarraqueano (LCR), permite o diagnóstico indireto da infecção. Na neurocisticercose a imunidade humoral vem sendo avaliada por diferentes técnicas, com características próprias. Assim, a reação de fixação de complemento (RFC) apresenta resultados que variam de acordo com o antígeno empregado e um resultado seguro depende certamente do antígeno, assim como de uma técnica perfeitamente padronizada para se evitar a baixa sensibilidade e especificidade até agora observadas^{20,24,30,31,37,39,40}. As reações de precipitação em tubos de gel de agar possibilitam diferenciar os sistemas antígenicos envolvidos, podendo também quantificar suas concentrações, mas sua utilização ainda é limitada, pois são pouco sensíveis e praticamente nenhum sucesso foi obtido no seu emprego como auxílio diagnóstico em LCR^{4,6,13,18,34}. A reação de hemaglutinação (RHA) é simples e rápida, entretanto para poder comparar os resultados entre laboratórios é necessário que se uniformize o método de preparo dos antígenos empregados pois, apesar de ser mais sensível que a RFC, ainda mostra inespecificidade elevada^{5,14,17,25,26,27,29,36}. Diferentes antígenos foram empregados para a padronização da reação de imunofluorescência (RIF) ao diagnóstico da cisticercose humana^{10,11,15,23,35,38}, a aplicabilidade dessa reação foi comprovada nos estudos de Bassi e col.^{2,3} e de Livramento²¹.

O teste imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) tem sido largamente empregado no diagnóstico de diferentes patologias, apresentando alta sensibilidade e especificidade, além de boa reprodutibilidade. O teste foi aplicado à cisticercose humana por Arambulo e col. utilizando como antígeno o extrato salino deslipidado de *Taenia solium* adulta e de seu cisticerco com resultados mais sensíveis para ELISA em comparação com RHA¹. O teste ainda mostrou-se reprodutível para os dois antígenos estudados e, em

* Professor Adjunto da Disciplina de Parasitologia Médica da Universidade Federal de Uberlândia, MG. Resumo da Tese de Doutorado do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (1983) realizada no Laboratório de Imunologia e Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

relação a especificidade, melhores resultados foram observados quando se utilizou o extrato total de *Taenia solium* adulta. Diwan e col. estudaram a sensibilidade do teste em duas regiões geograficamente distantes, México e Indonésia, em amostras de soros e LCR¹². Costa e col.⁹ iniciaram no Brasil a padronização do teste ELISA em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose comparando os resultados obtidos com os de RFC, RIF e RHA.

O objetivo do presente trabalho é estudar o teste imunoenzimático ELISA na neurocisticercose, investigando o comportamento de diferentes preparações antigênicas do *C. cellulosae* na detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro e de LCR e comparando-os a outros testes imunológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção de *C. cellulosae* — Cisticercos foram obtidos a partir de musculo esquelético de suínos portadores de infecção natural maciça. Os parasitas, separados por dissecação, resultaram em cisticercos íntegros e rompidos, que após 4 lavagens em solução salina (NaCl 0,15M) foram congelados em nitrogênio líquido e conservados a -70°C .

2. Obtenção dos extratos antigênicos — A partir dos cisticercos foram obtidos os extratos antigênicos descritos a seguir e que foram divididos em alíquotas de 0,5 ml e conservados a -70°C até o momento do uso.

2.1. Líquido de vesícula — Obtido por rompimento dos parasitas íntegros antes do congelamento, e centrifugados a 4.800 g por 15 minutos a 4°C .

2.2. Extrato salino total — Ressuspenderam-se 50 cisticercos, obtidos após o rompimento dos parasitas, em 5 ml de água destilada. Esta preparação foi submetida a homogenização em homogenizador elétrico Potter-Evelyn a 40^o por 5 minutos e posterior tratamento de ultrassom (Sonic Desmembrator, Quigley — Rochester, Inc, USA) a 40 KHz por 4 períodos de 30 segundos, em banho de gelo. Após isotonzificação com 5 ml de solução de NaCl 0,3 M, empregaram-se novamente três períodos de ultrassom. Em seguida, deixou-se a mistura a 4°C por duas horas sob agitação lenta e após, centrifugação a 10.000 g por 30 minutos a 4°C , o sobrenadante obtido constituiu o extrato salino.

2.3. Extrato alcalino total — Ressuspenderam-se 50 cisticercos, obtidos após o rompimento dos parasitas, em 5 ml de água destilada. Procedeu-se como descrito para o extrato salino, substituindo-se a solução de NaCl 0,3 M por 5 ml de NaOH 0,3 M, neutralizando o sobrenadante final com HCl 0,3 M.

2.4. Extrato de escólex — Obtiveram-se escólexes por dissecação dos cisticercos, imersos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em banho de gelo, com auxílio de bisturi e microscópio estereoscópico (modelo SMZ Nikon). Os escólexes foram congelados a -70°C . Para o preparo do extrato utilizaram-se 50 escólexes segundo metodologia e proporções descritas para o extrato salino total.

2.5. Extrato de membrana — 50 membranas dos cisticercos, congelados separadamente quando da obtenção dos escólexes, foram utilizados para o preparo do extrato conforme metodologia descrita em 2.2.

3. Dosagem de proteínas e polissacarídes — Determinou-se o teor protéico dos extratos pelo método do biureto (16), com exceção do extrato de escólex que, foi dosado pelo método de Lowry e col. (22). O teor polissacarídico dos extratos foram obtidos pelo método de Martirani e col. (23).

4. Soro — Obteram-se 182 amostras de soro, sendo 35 de pacientes com diagnóstico estabelecido de neurocisticercose, 11 de pacientes com doença de Chagas crônica, 10 de toxoplasmose, 10 de neurosífilis, 10 de paracoccidiodomicose, 9 de esquistossomose, 7 de malária e 90 soros de doadores de sangue sorologicamente normais. Utilizaram-se soros padrão positivo e negativo. Os soros de neurocisticercose e normais, colhidos por punção venosa e separados em alíquotas de 0,5 ml foram armazenados a -20° e os soros com outras afecções pertenciam ao Banco de Soros do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e estavam conservados em glicerina volume a volume, a -20°C .

5. Líquido cefalorraqueano — Obteram-se 115 amostras de LCR sendo 48 de pacientes com diagnóstico do neurocisticercose, 10 de pacientes com epilepsia, 7 com quadro do LCR na neurosífilis e 50 de pessoas selecionados clinicamente e que não apresentavam qualquer tipo de alteração no exame do LCR. Utilizou-se LCR padrão positivo e negativo. As amostras foram separadas em alíquotas de 1 ml e armazenadas a -20°C .

6. Preparo do conjugado imunoenzimático anti IgG humana-peroxidase — Utilizou-se um soro anti IgG humana produzido em carneiro que apresentava 32 unidades precipitantes pelo método de Ouchterlony (32) e linha específica de IgG na imunoeletroforese. Após precipitação salina com sulfato de amônio avaliou-se o teor protéico pelo método do biureto (16). A fração IgG foi então marcada com peroxidase (Type VI, Sigma Chem. Co, USA) segundo metodologia descrita por Wilson e Nakane (41), na proporção de 15 mg de enzima para 15 mg de proteína e posteriormente cromatografado em coluna de Sephadex G 100.

7. Teste imunoenzimático ELISA — Empregaram-se placas de polivinil (Plásticos AMPLA, São Paulo, Brasil) como suporte para a adsorção dos diferentes extratos antigênicos. As placas foram sensibilizadas a 4°C durante 18 horas com 0,2 ml de solução dos antígenos, na concentração ideal, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6. Para controle, sensibilizou-se a placa somente com tampão de diluição. Após esse período e três lavagens de 5 minutos em PBS Tween 20 a 0,05%, PBS-Tween (Polyxiethylene Sorbitan, Sigma Chemical Co., USA), adicionaram-se 0,2 ml de amostras de soros diluídos em PBS Tween 20, na razão 2, a partir de 1/20 ou de LCR não diluídos e diluídos na razão 2 e incubou-se por 45 minutos a 37°C . Após lavagens das placas com PBS Tween, adicionou-se o conjugado segundo o título e incubou-se por 45 minutos a 37°C . Após novas lavagens a reação foi revelada pela adição de 0,2 ml de substrato constituído de 0,05% de H_2O_2 juntamente com 0,08% de ácido 5-aminossalicílico e, após uma hora de incubação à temperatura ambiente, interrompeu-se a reação pela adição de 0,025 ml de uma solução de NaOH 1M a cada orifício da placa. A avaliação da intensidade de coloração obtida foi feita em espectrofotômetro Beckman DU-2, em cubetas de 1 mm, fenda 0,04 mm, no comprimento de onda de 450 nm.

8. Outras reações — 8.1. Reação de fixação do complemento — Utilizou-se a técnica de Kolmer e col (19) com antígeno metílico de *C. cellulosae*. Os soros conservados em glicerina não foram submetidos a este teste. 8.2. Reação de imunofluorescência — Utilizaram-se como antígeno cortes de 4 micra de cisticercos íntegros incluídos em «Tissue Teck» OCT (Ames Co. Miles Laboratory, Indiana, USA). O conjugado antiglobulina humana foi preparado por marcação com isotiocianato de fluoresceína

(Fluorescein Isothiocyanate Isomer I, International Biological Supplies Inc, USA) segundo técnica descrita por Clarck e Shepard (8). Avaliaram-se as reações em microscópio Zeiss equipado com lâmpada de mercúrio HBO 200, filtro de interferência KP 500 e filtro barreira 50. 8.3. Reação de hemaglutinação — Realizou-se a reação com hemácias sensibilizadas com líquido de vesícula de cisticercos segundo metodologia semelhante à descrita por Camargo e col. (7).

9. Análise estatística — Calculou-se a média geométrica dos títulos (MGT) segundo método de Paul e White (83) com a utilização de títulos codificados. No estudo dos soros, os títulos foram normalizados segundo fórmula $\log^2 (5 \times 2n)$. A fórmula $\log^2 (2n/4)$ foi utilizada para o estudo do LCR e da RFC para soros.

RESULTADOS

1. Avaliação dos diferentes extratos antigênicos — A determinação da concentração protéica e polissacarídica dos extratos de 50 cisticercos para volume final de 10 ml estão expressas na tabela 1. Nas figuras 1 e 2 constam respectivamente os resultados obtidos no teste imunoenzimático, utilizando-se soros e LCR padrão positivo e negativo, com extratos antigênicos em concentrações de 5, 10, 20 e 40 microgramas por mililitro e conjugado na diluição de 1/1400. Para os soros consideraram-se como resultado positivo as diluições dos extratos antigênicos que apresentavam absorbância maior ou igual a 0,100 ou seja, 10 unidades ELISA, (1 UE = densidade óptica x 100). Para os LCR consideraram-se como resultado positivo as diluições dos extratos que apresentavam absorbâncias maiores ou iguais a 0,50 ou 5 UE. A concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ foi escolhida para sensibilização das placas, para os 5 extratos, na pesquisa de anticorpos anticisticercos no soro e no LCR.

Antígenos	Proteínas (mg/ml)	Polissacárides (mg/ml)
Líquido de vesícula	13,0	3,0
Extrato salino total	7,0	4,0
Extrato alcalino total	5,0	3,0
Extrato de escólex	0,4	0,1
Extrato de membrana	3,0	0,6

Tabela 1 — Determinação da concentração de proteínas e de polissacárides nos diferentes extratos antigênicos de *Cysticercus cellulosae*.

ELISA NO DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE

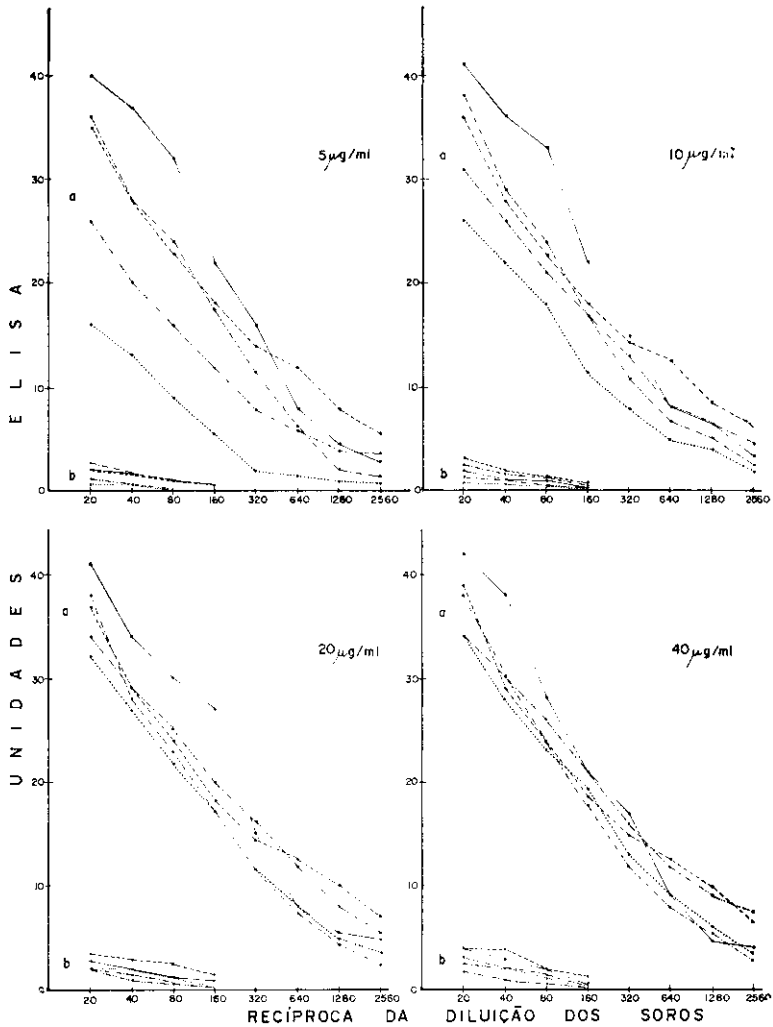


Fig. 1 — Curvas de reatividade do teste ELISA para soros padrão positivo (a) e negativo (b), com líquido de vesícula (—) e extratos salino total (---), alcalino total (-.-.-.-) de escolex (.....) e de membrana (-.-.-.-.-) de *C. cellulosae*, nas concentrações de 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml e 40 µg/ml.

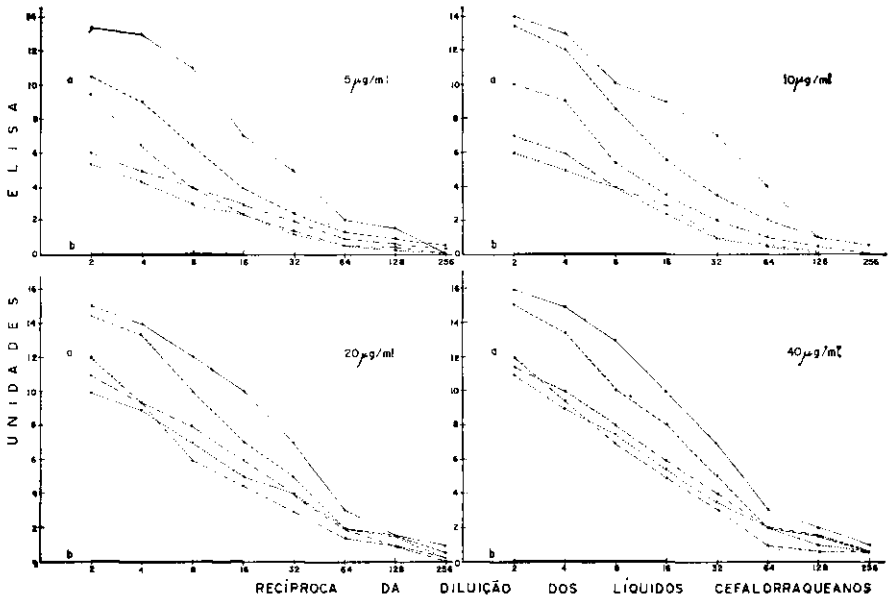


Fig. 2 — Curvas de reatividade do teste ELISA em líquido cefalorraqueano padrão positivo (a) e negativo (b) com líquido de vesícula (—) e extratos salino total (---), alcalino total (-.-.-), de escolix (.....) e de membrana (-.-.-.-) de *C. cellulosae*, nas concentrações de 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml 40 µg/ml.

2. Avaliação do teste imunoenzimático ELISA — 2.1. Estudo da sensibilidade e da especificidade — a) Soros: A sensibilidade (%) do teste ELISA para os diferentes extratos antigênicos do *C. cellulosae*, com limites de confiança de 95% de probabilidade, obtida em 35 soros de pacientes com neurocisticercose está expressa na figura 3. Com relação à especificidade estudada nos 147 soros verificou-se negatividade dos testes em todos os casos, com quaisquer extratos antigênicos. b) LCR: A sensibilidade (%) do teste ELISA obtida em 48 LCR de pacientes com neurocisticercose está expressa na figura 4. Quanto à especificidade, estudada em 67 LCR, observaram-se resultados negativos em todos os 50 normais e 10 casos de epilepsia. Somente um caso de neurosfilis, dos 7 testados, mostrou reação positiva em título 2 com líquido de vesícula e extrato salino total e título 1 com extrato de membrana, sendo não reagente com os extratos alcalino total e de escolix. 2.2. Distribuição da frequência dos títulos — a) Soros: Os soros de pacientes com neurocisticercose, reagentes pelo teste ELISA, apresentaram títulos que oscilavam entre: 20 e 2560 para líquido de vesícula ou extrato salino total; 20 e 1280 para extratos de escolix e de membrana;

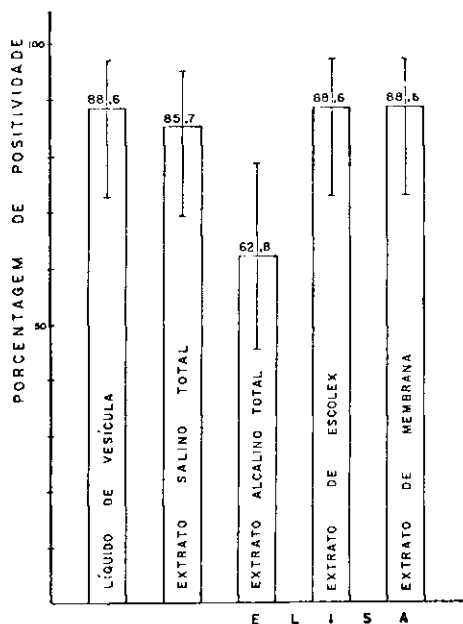


Fig. 3 — Sensibilidade (%) do teste ELISA para os diferentes extratos antigênicos de *C. cellulosae*, com limites de confiança de 95% de probabilidade, obtida em 35 soros de pacientes com neurocisticercose.

Testes	Espécimes	
	Soro	LCR
ELISA - líquido de vesícula	121,3	27,3
ELISA - extrato salino total	111,6	31,1
ELISA - extrato alcalino total	30,3	5,3
ELISA - extrato de escólex	63,2	14,8
ELISA - extrato de membrana	64,1	18,8

Tabela 2 — Médias geométricas de títulos das amostras de soro e de líquido cefalorraqueano (LCR) de pacientes com neurocisticercose.

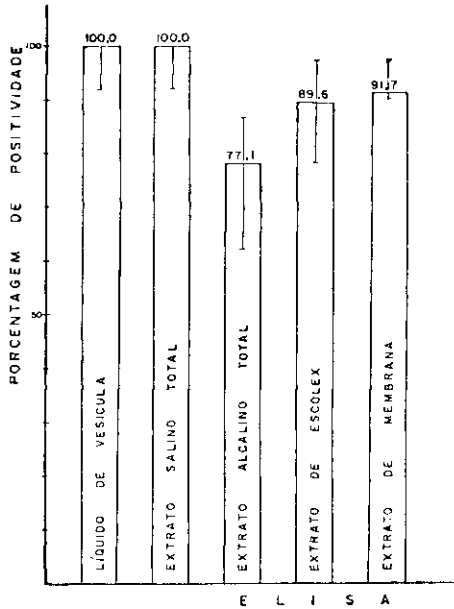


Fig. 4 — Sensibilidade (%) do teste ELISA para os diferentes extratos antigênicos de *C. cellulosae*, com limites de confiança de 95% de probabilidade, obtida em 48 líquidos cefalorraqueanos de pacientes com neurocisticercose.

20 e 640 para o extrato alcalino total. b) LCR: Os LCR de pacientes com neurocisticercose, reagentes pelo teste ELISA, apresentavam títulos que variavam de: 1 a 512 para líquido de vesícula ou extrato salino total; 2 a 128 para extrato alcalino total; 1 a 256 para extratos de escólex e de membrana. As médias geométricas dos títulos dos soros e LCR de neurocisticercose, no teste ELISA, com os diferentes extratos antigênicos estão expressas na tabela 2.

3. Comparação dos testes imunoenzimáticos com outros testes — Os soros e LCR foram submetidos, simultaneamente, a RFC, RIF e RHA, para cisticercose. A tabela 3 indica a sensibilidade, a especificidade e a MGT de cada teste. Nas tabelas 4 e 5 são apresentados respectivamente os resultados dos soros e LCR de neurocisticercose distribuídos segundo títulos em todos os testes utilizados.

Espécimes	Reações	Sensibilidade		Especificidade		MGT
		positivos/ total	porcentagem e LC-95%	negativos/ total	porcentagem e LC-95%	
S	Fixação de complemento	28/35	80,0 (63,0 a 91,6)	90/90	100,0 (96,0 a 100,0)	5,5
O	Imunofluorescência	28/35	80,0 (63,0 a 91,6)	143/147	97,3 (92,5 a 100,0)	56,2
O	Hemaglutinação	30/35	85,7 (69,7 a 95,2)	139/147	94,6 (91,0 a 98,3)	133,6
L	Fixação de complemento	41/48	85,4 (72,2 a 93,9)	67/67	100,0 (94,6 a 100,0)	3,8
C	Imunofluorescência	42/48	87,5 (74,6 a 95,3)	67/67	100,0 (94,6 a 100,0)	5,4
R	Hemaglutinação	48/48	100,0 (92,6 a 100,0)	67/67	100,0 (94,6 a 100,0)	32,9

Tabela 3 — Sensibilidade e especificidade, com limites de confiança de 95% (LC-95%) de probabilidade e média geométrica de títulos (MGT) da reação de fixação de complemento, reação de imunofluorescência e hemaglutinação em amostras de soro e de líquido cefalorraqueano (LCR) de pacientes com neurocisticercose, de normais e de pacientes com outras afecções.

Testes	Títulos									
	<20	20	40	80	160	320	640	1280	2560	>2560
ELISA - líquido de vesícula	4	4	5	5	4	4	3	5	1	0
ELISA - extrato salino total	5	3	7	3	5	3	4	3	2	0
ELISA - extrato alcalino total	13	7	5	5	2	2	1	0	0	0
ELISA - extrato de escólex	4	9	5	4	7	3	2	1	0	0
ELISA - extrato de membrana	4	9	4	5	7	3	2	1	0	0
Reação de imunofluorescência	7	2	9	10	1	4	1	1	0	0
Reação de hemaglutinação	5	1	3	10	2	8	2	0	2	2
	Unidades Kolmer									
	<1	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Reação de fixação de complemento	7	0	3	5	8	7	3	1	1	0

Tabela 4 — Distribuição de 35 amostras de soro de pacientes com neurocisticercose segundo títulos nos testes imunoenzimático, de imunofluorescência, de hemaglutinação e de fixação de complemento.

Testes	Títulos										
	<1	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
ELISA - líquido de vesícula	0	2	1	4	6	9	8	8	4	4	2
ELISA - extrato salino total	0	1	5	1	4	8	9	8	4	6	2
ELISA - extrato alcalino total	11	0	3	4	13	5	1	7	1	0	0
ELISA - extrato de escólex	5	1	2	5	2	13	7	6	5	2	0
ELISA - extrato de membrana	4	1	2	4	3	11	7	8	3	5	0
Reação de imunofluorescência	6	1	5	9	13	9	5	0	0	0	0
Reação de hemaglutinação	0	3	2	7	3	6	7	8	9	2	1
Reação de fixação de complemento (título Unidades Kolmer)	7	2	10	9	13	4	2	1	0	0	0

Tabela 5 — Distribuição de 48 amostras de líquido cefalorraqueano de pacientes com neurocisticercose segundo títulos nos testes imunoenzimático, de imunofluorescência, de hemaglutinação e de fixação de complemento.

COMENTÁRIOS

Os diferentes componentes do cisticerco, como líquido de vesícula e extratos totais ou de escólex ou membrana, mostraram atividades antigênicas quando sob forma de fase sólida, absorvidos a superfícies de plástico, no teste imunoenzimático ELISA, com soros ou LCR de pacientes com neurocisticercose. Após padronização do teste com os vários componentes do parasita, verificou-se que a sensibilização de placas de polivinil com soluções antigênicas com 20µg de proteínas por ml forneciam reatividade ideal. Determinou-se como limite de reatividade 10 UE para soro e 5 UE para LCR. O teste imunoenzimático, descrito por Arambulo e col.¹ e Diwan e col.¹², foi simplificado principalmente na redução do tempo de sensibilização das placas, e no tempo de incubação dos reagentes. Assim, foi excluída a sensibilização prévia da placa em banho maria e os tempos de incubação dos reagentes foram reduzidos para 45 minutos.

O estudo de 182 amostras de soro e 115 de LCR forneceu os índices de sensibilidade e especificidade do teste. Maior sensibilidade foi obtida no estudo dos LCR: 100% para antígenos de líquido de vesícula e extrato salino total; 91,7% para o extrato de membrana; 89,6% para extrato de escólex; 77,1% para o extrato alcalino total; para o soro foram obtidos os seguintes índices: 88,6% para líquido de vesícula e extratos de escólex e membrana; 85,7% para o extrato salino total; 62,8% para o extrato alcalino total.

Como observado para os demais testes, como de fixação de complemento, imunofluorescência e hemaglutinação, também para o ensaio imunoenzimático o diagnóstico imunológico da neurocisticercose mostrou-se nitidamente mais sensível quando as reações foram realizadas no LCR que no soro. Quanto à especificidade obteve-se 100% para os soros frente a todos antígenos estudados e 98,5% para os LCR frente a antígeno de membrana, salino total e líquido de vesícula. Para o extrato de escólex e alcalino total a especificidade foi de 100% em LCR. Os títulos nos soros variaram de 20 a 2.560 e nos LCR de 1 a 512. A média geométrica de títulos dos soros foi: 121,3, 111,6, 30,3, 63,2 e 64,1 para líquido de vesícula, extratos salino e alcalino totais, antígeno de escólex e de membrana, respectivamente; a MGT nas amostras de LCR foi: 27,3, 31,1, 5,3, 14,8 e 18,8 para os mesmos extratos antigênicos. Estes resultados são superiores aos obtidos por Arambulo e col.¹ e Diwan e col.¹², tanto em termos de especificidade quanto em termos de sensibilidade e confirmaram os anteriormente obtidos por Costa e col.⁹.

O estudo comparativo do teste ELISA com os diferentes extratos antigênicos em relação a outros testes foi feito pela determinação da sensibilidade, especificidade e média geométrica dos títulos das reações de fixação de complemento, imunofluorescência e hemaglutinação. Observamos que para os soros a sensibilidade da RHA foi igual à observada no teste ELISA-extrato salino total, superior nos extratos alcalino total e inferior nos outros três extratos. As reações de fixação de complemento e de imunofluorescência foram menos sensíveis que o teste ELISA para todos os extratos estudados, com exceção do extrato alcalino. A especificidade variou, sendo de 100% para RFC, 97,3% para RIF e de 94,6% para RHA. Os 4 casos que determinaram a queda de

especificidade para RIF foram de pessoas classificadas como aparentemente normais que apresentavam títulos iguais a 20. Na RHA observamos três soros reagentes de pacientes com malária, dois com títulos de 20 e um com título de 40 e outros 5 soros de pessoas aparentemente normais reativos com títulos de 20. As MGT dos soros foram respectivamente de 5,5, 56,2 e 133,6 para as RFC, RIF e RHA, observando que a RHA apresentou média geométrica superior à do teste ELISA para os diferentes extratos antigênicos e a RIF média inferior aos testes ELISA com exceção da obtida com o extrato alcalino total. Com relação à reação de fixação de complemento, em comparação com o teste ELISA, observamos que o teste ELISA evidenciou títulos muito mais elevados.

Para o LCR observou-se sensibilidade de 85,4%, 87,5% e 100% respectivamente nas reações de fixação de complemento, imunofluorescência e hemaglutinação. A reação de fixação de complemento foi menos sensível que o teste ELISA com os antígenos testados, com exceção do extrato alcalino total. A reação de hemaglutinação foi concordante com o teste ELISA para os líquidos de vesícula e extrato salino total e mais sensível para os outros extratos. A especificidade de 100% para as RFC, RIF e RHA foi concordante com o teste ELISA quando utilizados os extratos alcalino total ou extrato de escólex e superior aos outros três extratos. A média geométrica de títulos dos LCR foi de 3,8, 5,4 e 32,9 respectivamente para as RFC, RIF e RHA. Observamos que a RHA apresentou média geométrica de títulos superior ao teste ELISA para três extratos testados. A MGT da RFC foi inferior à das outras reações e à do teste ELISA para os diferentes antígenos enquanto a RIF apresentou MGT inferior à dos testes ELISA com os diferentes extratos, com exceção do extrato alcalino total que foi praticamente igual.

A avaliação da praticidade do antígeno foi feita em função dos diferentes componentes antigênicos obtidos. O preparo do líquido de vesícula tem como inconveniente o grande número de parasitas necessários para a obtenção de pequenos volumes de antígeno e a neutralização do extrato antigênico para obtenção do extrato alcalino provoca desnaturação proteica, alterando o rendimento final. O preparo do antígeno de escólex tem como inconveniente a dissecação microscópica do parasita, o mesmo acontecendo para o preparo do antígeno de membrana. Esses fatos foram de importância para a escolha do extrato salino total, para estudos individuais ou epidemiológicos. Este pode ser preparado a partir de cisticercos íntegros ou rompidos. A partir de 50 cisticercos é preparado antígeno suficiente para 15.000 reações qualitativas. O teste imunoenzimático ELISA com extrato salino total é recomendado, como alternativa diagnóstica em substituição às reações de fixação do complemento, imunofluorescência e hemaglutinação na pesquisa de anticorpos circulantes no soro ou no líquido cefalorraqueano. O teste ELISA tem a vantagem da simplicidade e estabilidade dos reagentes, sendo uma técnica prática para uso em inquéritos epidemiológicos ou em rotina laboratorial, sem o uso de reagentes biológicos como na RFC ou necessidade de equipamento de eletroforese ou mesmo microscópico. Para uso em campo, se tivermos bons padrões positivos e negativos de soro ou LCR, as leituras podem ser realizadas visualmente.

RESUMO

Estudou-se o teste imunoenzimático ELISA na neurocisticercose humana investigando o comportamento de diferentes antígenos do *Cysticercus cellulosae* na detecção de anticorpos específicos em amostras de soro e de líquido cefalorraqueano (LCR). Obtiveram-se 5 extratos antigênicos: líquido de vesícula e extrato salino total, alcalino total, de escólex e de membrana. A concentração de 20µg/ml foi ideal para sensibilização das placas de polivinil para os 5 extratos preparados, tanto para soro como para LCR. A anti IgG humana marcada com peroxidase foi utilizada no título de 1.400 e a reação revelada pela adição de H₂O₂-ácido 5-amino salicílico, determinando-se como limite de reatividade 10 UE para soro e 5 UE para LCR. Estudaram-se 182 amostras de soro e 115 amostras de LCR. A sensibilidade do teste ELISA em relação aos soros variou, sendo de mesmo valor para o líquido de vesícula, extrato de escólex e de membrana (88,6%) extrato salino total (85,7%) e extrato alcalino total (62,8%). A sensibilidade do teste ELISA em relação ao LCR foi de 100% para o líquido de vesícula e extrato salino total, 91,7% para o extrato de membrana, 89,6% para o extrato de escólex e 77,1% para o alcalino total. A especificidade do teste ELISA em amostras de soro foi de 100% para os 5 extratos estudados. Em relação ao LCR, foi de 100% para o extrato alcalino e de escólex e de 98,5% para os demais. As médias geométricas dos títulos dos soros e LCR nos testes ELISA variaram, sendo respectivamente de 121,3 e 27,3 para o líquido de vesícula, 111,6 e 31,1 para o extrato salino total, 30,3 e 5,3 para o alcalino total, 63,2 e 14,8 para o de escólex e 64,1 e 18,8 para o de membrana. Comparou-se o teste ELISA com os diferentes antígenos com a reação de fixação do complemento, reação de imunofluorescência e reação de hemaglutinação para amostras de soro e LCR. O teste imunoenzimático ELISA com extrato salino total, pela facilidade de preparo, rendimento obtido (a partir de 50 cisticercos prepara-se antígeno suficiente para 15.000 reações qualitativas) e pela alta sensibilidade e especificidade, é recomendado como alternativa diagnóstica em substituição à reação de fixação do complemento, RIF e RHA, na pesquisa de anticorpos IgG circulantes no soro e LCR na neurocisticercose.

SUMMARY

ELISA immunoenzymatic assay for neurocysticercosis: different antigenic extracts for IgG antibodies to Cysticercus cellulosae in cerebrospinal fluid and serum samples.

Five different antigens from *Cysticercus cellulosae*, a vesicular fluid, a saline and an alkaline total extracts, an scolex and membrane, were studied in the ELISA immunoenzymatic assay to demonstrate IgG antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples. For the 5 antigens the 20µg/ml concentration was selected for polyvinyl plates sensitization for CSF and serum assays. The IgG fraction of a sheep anti-human IgG antiserum was labeled with horseradish peroxidase and revealed with hydrogen peroxide-5-aminosalicylic

acid. For positive results 10 ELISA Units for sera and 5 EU for CSF were taken. A total of 182 serum samples and 115 CSF samples were tested. The ELISA sensitivity for sera were 88.6% for vesicular fluid, escolex and membrane; 85.7% for saline extract and 62.8% for alkaline extract. The ELISA sensitivity for CSF was 100% for vesicular fluid and saline total extract, 91.7% for membrane, 89.6% for excolex and 77.1% for alkaline. The ELISA specificity for sera was 100% to the 5 antigens studied; to the CSF was 100% for the alkaline and escolex and 98.5% for the other antigens. An ELISA geometric mean titer of sera and CSF was respectively the 121.1 and 27.3 for vesicular fluid, 111.6 and 31.1 for saline total extract, 30.3 and 5.3 for alkaline total extract, 63.2 and 14.8 for escolex and 69.1 and 18.8 for membrane antigen. ELISA was then compared to immunofluorescence, hemagglutination and complement fixation tests in CSF and sera. ELISA immunoenzymatic assay with saline total extract is recommended for the easy preparation and for the high quantity of antigens obtained, for the high sensitivity and great specificity for sera and CSF; we suggest that this test may be used as a substitute for immunofluorescence, hemagglutination and complement fixation in sera or CSF for the diagnosis of neurocysticercosis.

REFERENCIAS

1. ARAMBULO III, P.V.; WALLS, K.W.; BULLOCK, S. & KAGAN, I.G. — Sero-diagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immuno specific assay (ELISA). *Acta tropica* 35: 63, 1978.
2. BASSI, G.E.; CAMARGO, M.E.; BITTENCOURT, J.M.T. & CERQUEIRA, F.E.C. — Comparação entre as reações de fixação de complemento e imunofluorescência em líquidos cefalorraqueanos. *Neurobiol. (Recife)* 42: 231, 1979.
2. BASSI, G.E.; CAMARGO, M.E.; BITTENCOURT, J.M.T. & GUARNIERI, D.B. — Reação de imunofluorescência com antígenos de *Cysticercus cellulosae* no líquido cefalorraqueano. *Neurobiol. (Recife)* 42: 165, 1979.
4. BELTRAN, H.F. & GOMEZ PRIEGO, A. — Evaluación de los contraímmunoelectroforesis (CIEF) para la detección de anticuerpos en la cisticercosis experimental y humana. *Antioquia méd.* 23: 472, 1973.
5. BIAGI, F.F.; NAVARRETE, F.; PINA, A.; SANTIAGO, A.M. & TAPIA, L. — Estudio de tres reacciones serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis. *Rev. med. Hosp. Gen. (México)* 25: 501, 1961.
6. BIAGI, F.F. & TAY, J. — A precipitation reaction for the diagnostic of cysticercosis. *Amer. J. trop. med. Hyg.* 7: 63, 1958.
7. 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.
8. CLARK, H.F. & SHEPARD, C.C. — A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. *Virology* 20: 642, 1963.
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: 327, 1982.
10. DAO, C.; ARNAULT, J.P.; PETITHORY, J. & BRUMP, L. — L'immunofluorescence indirecte sur coupes de *T. solium* dans le diagnostic de la cysticercose: resultats obtenus chez 35 malades. *Nouv. Presse med.* 1: 2049, 1972.

11. DAO, C.; ARNAULT, J.P.; PETITHORY, J. & BRUMP, L. — Apport de la technique de fluorescence indirecte au diagnostic immunologique de la cysticerose humaine. *Ann. Parasit. hum. comp.* 48: 23, 1973.
12. DIWAN, A.R.; COKER-VANN, M.; BROWN, P.; SUBIANTO, 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.
13. FLISSER, A.; TARRAB, R.; WILLMS, K. & LARRALDE, C. — Immuno-electroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. *Arch. Invest. médica (México)*. 6: 1, 1975.
14. GOLDSMITH, R.S.; KAGAN, I.G.; REYES-GONZALES, M.A. & CEDENO FERREIRA, J. — Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca México. 1 — Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. *Bol. Ofic. sanit. panamer.* 71: 500, 1971.
15. GONZALES-BARANCO, D.; SANDOVAL-ISLAS, M.E. & TRUJILLO-VALDES, V.M. Reacción de inmunofluorescencia indirecta en cisticercosis. *Arch. Invest. medica (México)* 9: 51, 1978.
16. GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J. & DAVID, M.M. — Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem.* 177: 751, 1946.
17. GRISOLIA, J.S. & WIEDERHOLT, W.C. — CNS cysticercosis. *Arch. Neurol.* 39: 540, 1982.
18. IVANOVIC, D. — Counter immunoelectrophoresis: a tool in the diagnosis cerebral cysticercosis. *Rev. med. (Chile)* 108: 918, 1980.
19. KOLMER, J.A.; SPAULDING, E.M. & ROBINSON, H.W. — *Approved Laboratory Technic*. Ed. 5. Appleton Century Crofts, New York, 1951, pg. 797.
20. LANGE, O. — Síndrome líquórica da cisticercose encefalomeningea. *Rev. Neurol. Psiquiat. São Paulo* 6: 35, 1940.
21. LIVRAMENTO, J.A. — Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 39, 261, 1981.
22. LOWRY, V.H.; ROSEMBROUCH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193: 265, 1956.
23. MACHADO, A.J.; CAMARGO, M.E. & HOSHINO, S. — Reação de imunofluorescência para a cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas a lâminas de microscopia. *Rev. Soc. bras. Med. trop.* 7: 181, 1973.
24. MAGALHÃES, A.E.A. — Reação de fixação do complemento para cisticercose no líquido cefalorraquidiano: emprego de novo antígeno por método quantitativo. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 15: 183, 1957.
25. MAHAJAN, R.C.; CHITKARA, N.L. & CHOPRA, J.S. — Evaluation of cysticercous and adult worm antigens in serodiagnosis of cysticercosis. *Indian J. med. Res.* 62: 1310, 1974.
26. MARTÍNEZ, B. — Diagnostico serológico de la cisticercosis. *Prensa méd. Mex.* 28: 26, 1963.
27. MARTINEZ-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. méd. (México)* 11: 347, 1980.
28. 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.
29. McCORMICK, G.F.; ZEE, C.S. & HEIDEN, J. — Cysticercosis cerebri: review of 127 cases. *Arch. Neurol.* 39: 534, 1982.
30. MONTEIRO SALLES, F.J. — Cisticercose cerebral. Tese. Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo. São Paulo, 1934.

31. MOSES, A. — Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cisticercoses. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 3: 320, 1911.
32. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reactions in gels. Acta path. microbiol. scand. 26: 507, 1949.
33. PAUL, J.R. & WHITE, G. — Serological Epidemiology. Academic Press, London, 1973.
34. PETITHORY, J.; JAY, M. & FEILLET, J. — Le diagnostic par immunoelectrophorese et Ouchterlony de la cysticercose. Encéphale 60: 24, 1971.
35. PITA, V.R.; PRATT, G.V. & BIAGI, F.F. — Antígenos detectables por immunofluorescencia, en corpusculus calcareos de *Cysticercus cellulosae*. Rev. Fac. Med. (México) 7: 379, 1965.
36. PROCTOR E.M.; POWELL, S.J. & ELSDON-DEW, R. — The serological diagnosis of cysticercosis. Ann. trop. Med. Parasitol. 60: 146, 1966.
37. 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.
38. RYDZEWSKI, A.K.; CHISHUM, E.S. & KAGAN, I.G. — Comparison of serologic tests for human cysticercosis by indirect hemmagglutination, indirect immunofluorescent antibody, and agar gel precipitin tests. J. Parasit. 61: 154, 1975.
39. SPINA FRANÇA, A. — Aspectos biológicos da neurocisticercose: alterações do líquido cefalorraquidiano. Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo) 20: 17, 1962.
40. WEINBERG, M. — Recherche des anticorps spécifiques dans la distomatose et la cysticercose. C.R. Soc. Biol. (Paris) 66: 219, 1909.
41. WILSON, M.B. & NAKANE, P.K. — Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In W. Knapp, K. Holubán & G. Wick. (eds.): Immunofluorescence and Related Techniques. North-Holland Biomedical, Amsterdam, 1978, pg. 215.

Centro de Ciências Biomédicas, Campus Umuarama, Universidade Federal de Uberlândia - 38.400 - Uberlândia, MG - Brasil.