

## Detecção de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina no imunoblot

### Detection of important peptides for bovine cysticercosis diagnosis in immunoblot

Aline Giroto<sup>1</sup> Paulo Sérgio de Arruda Pinto<sup>1\*</sup> Júlio César de Oliveira Dias<sup>1</sup>  
Leandro Siqueira Chaves<sup>1</sup> Hanna Carolina Campos Ferreira<sup>1</sup>

#### RESUMO

A dificuldade de se localizar cisticercos em bovinos com infecção discreta torna o diagnóstico tradicional da cisticercose bovina em matadouros um recurso de baixa sensibilidade, o que gera uma demanda de diagnóstico por métodos alternativos como o imunoblot. Para tanto, neste trabalho, foram realizados ensaios de imunoblot a fim de analisar os peptídeos responsáveis pela reação do antígeno vesicular de *Taenia crassiceps*. Foram utilizadas 28 amostras de soro de bovinos comprovadamente negativos e 28 amostras coletadas de bovinos infectados experimentalmente com ovos de *Taenia saginata*. Os resultados dos ensaios de imunoblot com as amostras de soros-controle mencionadas indicaram que os peptídeos de 4-6, 14 e 18kDa destacaram-se entre os demais, mostrando altas taxas de desempenho no diagnóstico da cisticercose bovina e uma aparência diferenciada, com área e largura maiores, ao contrário dos peptídeos de média e alta massa molecular, que se apresentaram sob a forma de linha e com reações inespecíficas. O imunoblot mostrou ter um potencial como uma alternativa de diagnóstico da cisticercose bovina, incluindo sua aplicação em animais vivos, como método auxiliar de diagnóstico em estudos epidemiológicos da doença.

**Palavras-chave:** cisticercose bovina, *Taenia saginata*, *Taenia crassiceps*, imunoblot, peptídeos.

#### ABSTRACT

The diagnosis of cysticercosis in bovines that presents discreet infection is committed by the conventional methodology of detection employed in slaughterhouses. This deficiency leads to the development of alternative methods, such as immunoblot, in order to improve the detection of this disease. An immunoblot assay was developed to detect peptides from *Taenia crassiceps* antigen and it was used to test 56 samples

of bovine serum (28 confirmed as negative and 28 from experimentally infected animals with *Taenia saginata* eggs). The peptides 4-6, 14 and 18 kDa showed better performance in bovine cysticercosis diagnosis due to an enhanced appearance, once they showed higher area and wide, contrasting with medium and high molecular weight peptides, that showed unspecific reactions and discreet appearance. The obtained results indicated that immunoblot can represent a potential alternative in bovine cysticercosis diagnosis, including its use in live animals, improving the detection of this disease even in epidemiological studies.

**Key words:** bovine cysticercosis, *Taenia saginata*, *Taenia crassiceps*, immunoblotting, peptides.

#### INTRODUÇÃO

A cisticercose bovina é a zoonose parasitária causada pela larva da *Taenia saginata* mais frequentemente diagnosticada em matadouros, representando a principal causa de condenação de bovinos e acarretando prejuízos à pecuária (UNGAR et al., 2008). Assim, medidas eficientes de diagnóstico e controle dessa doença devem ser disponibilizadas.

Considerando que o diagnóstico rotineiro da cisticercose bovina é baseado no exame anátomo-patológico realizado durante a inspeção *post mortem* de carcaças e vísceras em matadouros, observa-se que esse recurso diagnóstico é de baixa sensibilidade, dada a dificuldade de se localizarem cisticercos nos tecidos bovinos com infecção discreta, os quais representam a maioria dos casos encontrados.

<sup>1</sup>Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: pintopsa@ufv.br.

\*Autor para correspondência.

Nesse contexto, faz-se necessária a associação de métodos imunológicos como o ELISA e o immunoblot, que apresentam alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da doença (MINOZZO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2007). Tais métodos apresentam ainda a vantagem de poderem ser utilizados no diagnóstico de animais vivos em estudos epidemiológicos (PERALTA et al., 2001).

Embora o emprego do immunoblot no diagnóstico da cisticercose bovina ainda seja pouco conhecido, esse método já vem sendo utilizado com sucesso no diagnóstico da cisticercose suína e humana (TSANG et al., 1989; GEKELER et al., 2002; SATO et al., 2003), realizado com extratos antigênicos de larvas de *Taenia saginata*, *Taenia solium* e *Taenia crassiceps*. A existência de peptídeos comuns entre as larvas dos referidos parasitas facilitou os ensaios laboratoriais, permitindo para essa finalidade a escolha de antígenos de *Taenia crassiceps*, um cestódeo parasita de raposas, cuja forma larvária é encontrada naturalmente em pequenos roedores e se reproduz por brotamento em laboratório (VAZ et al., 1997; BUENO et al., 2000). A homogeneidade dos lotes antigênicos preparados com larvas de *Taenia crassiceps* e a possibilidade de sua manutenção em laboratório são vantagens da utilização destes sobre os outros dois tipos de extratos antigênicos.

Considerando que o immunoblot tem mostrado um bom desempenho no diagnóstico da cisticercose suína e humana e que ainda não vem sendo utilizado para o diagnóstico da cisticercose bovina, pretende-se avaliar o emprego desse método na detecção de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina, utilizando o antígeno de *Taenia crassiceps*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nos ensaios de immunoblot, foram utilizados o antígeno vesicular de *Taenia crassiceps* e 28 amostras referentes aos soros-controle de 28 animais negativos para cisticercose e 28 amostras de soros-controle coletadas em quatro bovinos experimentalmente infectados com ovos de *Taenia saginata*, em diferentes fases de evolução da doença (intervalos de 15 dias), a partir dos 90 dias da inoculação dos ovos. Para comprovar se as amostras de soro foram obtidas de animais seguramente positivos e negativos, foi realizado o exame anátomo-patológico minucioso das carcaças desses animais após abate, por meio de incisões delgadas, para localização dos cisticercos.

### Obtenção dos parasitas

Os bovinos foram inoculados com auxílio de sonda gástrica, por via oral, com cerca de 120.000 ovos de *Taenia saginata*. Vencido o período de desenvolvimento da cisticercose, os bovinos inoculados foram abatidos após sua insensibilização e sangria, sendo realizado o exame anátomo-patológico minucioso dos tecidos para a coleta dos cisticercos de *T. saginata*.

Os metacestódeos de *Taenia crassiceps* foram mantidos em camundongos BALB/c com idade entre oito e 12 semanas por inoculação intraperitoneal de 10 parasitas de pequeno tamanho. Após 90 dias, os animais que apresentavam aumento de volume abdominal foram sacrificados sob insensibilização em éter etílico, seguida de sangria; os parasitas foram retirados da cavidade abdominal em seguida.

Na preparação do antígeno de líquido vesicular (LVcra), os parasitas íntegros foram centrifugados a 35.000g por 30 minutos a 4°C, desprezando-se o sedimento. Ao sobrenadante foi adicionado inibidor de protease Sigma P7626 (PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) na concentração de 2,5mM de extrato antigênico, constituindo-se assim o antígeno LVcra, que foi conservado a -20°C.

### Immunoblot

A separação dos peptídeos do antígeno vesicular de *Taenia crassiceps* foi conduzida pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), realizada em sistema descontínuo segundo Laemmli (1970), no aparelho Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A amostra de antígeno (30µg) foi diluída em solução tampão de amostra (Trizma 60mM, pH6,8, SDS 2%, glicerol 25%, 2-mercaptoetanol, 14,4mM e azul de bromofenol 0,1%), submetida a aquecimento em banho-maria a 100°C por cinco minutos imediatamente antes da sua aplicação no gel de empilhamento a 5% (Tris-HCl 0,5M, pH6,8, contendo 0,025% de SDS) e separada em gel em gradiente entre 5 e 20% (solução tamponada Tris-HCl 1,5 pH 8,8, contendo 0,025% de SDS). Foram aplicados 6µg de antígeno por mm de orifícios medindo 3 cm cada. Paralelamente à eletroforese das amostras, utilizou-se o marcador de massa molecular Sigma M 4038 (Sigma Chemical Co., Louis, MO, USA). A eletroforese foi conduzida em solução tampão de corrida (Trizma 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%, pH 8,3) a uma voltagem de 50V no empilhamento e 100V na separação.

Os peptídeos separados por SDS-PAGE foram transferidos do gel para membranas de

nitrocelulose de 0,2 $\mu$  (Millipore, USA), segundo a metodologia descrita por TOWBIN et al. (1979), utilizando solução tamponada de transferência (Tris-hidroximetilaminoetano 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, pH 8,3). A transferência foi realizada durante um período de meia hora, à temperatura ambiente, voltagem constante de 100V e outro período de duas horas com voltagem de 150V. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas em solução aquosa contendo Ponceau-S a 0,5%.

A partir das membranas, foram obtidas tiras de 3 a 4mm de largura que, em seguida, foram descoradas e lavadas em solução salina (NaCl 0,15M) contendo 0,05% de Tween-20, sendo armazenadas em papel filtro até o momento de sua utilização nas etapas seguintes do teste. As tiras foram tratadas com solução bloqueadora [leite desnatado, Molico – Nestlé, dissolvido a 5% em Tris-salina (Tris-hidroximetilaminoetano 10mM, NaCl 0,15M, pH 7,4)] por uma hora sob agitação lenta à temperatura ambiente. As amostras de soro adicionadas à solução diluidora (Solução bloqueadora diluída a 1:5 em Tris-salina) foram adicionadas às tiras, que foram incubadas por 14-18 horas, a 4°C, sob agitação lenta. Após seis lavagens, cinco minutos cada, as tiras foram novamente incubadas por uma hora com o conjugado anti-IgG de bovino marcado com peroxidase, devidamente diluído (A 5295, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). As proteínas reativas foram evidenciadas com a solução cromógena (Diaminobenzidina 5mg, H<sub>2</sub>O 1,5% em PBS pH 7,2) por cerca de dois minutos. Em seguida, as tiras foram lavadas com água destilada e secas em papel filtro.

Após ensaios preliminares de padronização, foram analisadas em cada ensaio (placa) do imunoblot: duas amostras positivas, duas negativas e um controle branco.

#### Análise de dados

Foi determinada a frequência média de reação dos diferentes peptídeos com os soros-controle dos dois grupos de bovinos, conforme sua condição anatomo-patológica pré-determinada.

Foram selecionados os peptídeos que reagiram somente com as amostras de soros positivas. Esses peptídeos foram provisoriamente identificados como importantes, observando os critérios de localização (massa molecular) e aparência, recomendados por Larralde et al. (1989) e analisados pelo Programa Quantity One, versão 4,6 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Em função da sua frequência de reatividade, foram determinados os seguintes parâmetros para cada peptídeo: as taxas de

sensibilidade e especificidade, os valores preditivos positivos e negativos e a concordância, visando estabelecer os critérios para diferenciação das amostras de soros como positivas ou negativas ao imunoblot, bem como definir os peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

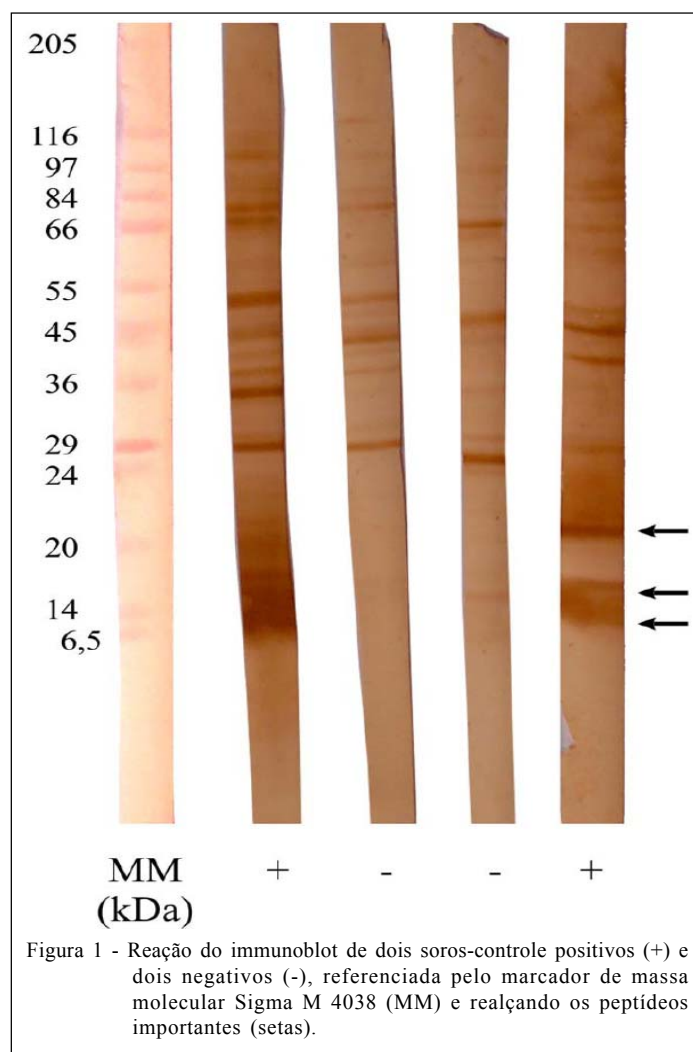
Nas etapas de padronização da eletroforese e do imunoblot, optou-se por utilizar as concentrações de 1:25 para os soros e 1:2000 de conjugados em função dos melhores resultados obtidos na diferenciação preliminar entre soros-controle positivos e negativos.

Diversos peptídeos foram frequentemente reconhecidos nas reações com as amostras de soros testadas (4-6, 14, 18, 23, 24-26, 34-36, 43-45, 51-56, 60-63, 92-93, 100-106kDa); entretanto, apenas os peptídeos de 4-6, 14 e 18kDa apresentaram valor diagnóstico. As bandas de 4-6, 14 e 18kDa destacaram-se entre as demais, mostrando uma aparência diferenciada, com área e largura maiores (Figura 1). Com menor destaque, os peptídeos de média e alta massa molecular apresentaram-se sob a forma de linha, aparência também observada por PINTO et al. (2001) no diagnóstico da cisticercose suína.

As melhores taxas de desempenho foram observadas para os peptídeos de baixa massa molecular, principalmente do peptídeo identificado como 14kDa (Tabela 1). Utilizando antígenos recombinantes de *Taenia solium*, Greene et al. (2000) mostraram que o peptídeo de 14kDa é importante no diagnóstico da cisticercose humana pelo teste ELISA, não obtendo mesmo êxito com o peptídeo de 18kDa.

Em virtude da falta de dados referentes à utilização do imunoblot na pesquisa de anticorpos em bovinos, foram comparados os resultados desta pesquisa com os reportados em testes com amostras humanas e suínas. O desempenho do imunoblot verificado em outras pesquisas é semelhante ao mostrado nesta pesquisa, reportando altas taxas. GEKELER et al. (2002) encontraram taxas de especificidade variando entre 80 e 82%. Examinando suínos, GONZÁLEZ et al. (1990), PATHAK et al. (1994) e PINTO et al. (2001) encontraram taxas de sensibilidade e especificidade entre 97 e 100%.

Levando em consideração o risco para saúde pública e os prejuízos econômicos da cisticercose, tanto para os matadouros, quanto para os pecuaristas, medidas de controle sanitário dessa zoonose devem ser tomadas não só no momento do abate, mas também na fase de produção. Nesse sentido,



o desenvolvimento de um método de diagnóstico confiável como o imunoblot poderia servir como alternativa para o aperfeiçoamento das ações de inspeção nos matadouros e das investigações epidemiológicas na rastreabilidade dos focos de cisticercose. Entretanto, pesquisas com variações no protocolo devem ser realizadas visando ampliar a avaliação do desempenho diagnóstico dos peptídeos relatados, bem como do potencial diagnóstico de diferentes antígenos, como o total e de membrana de *Taenia crassiceps*, empregando o imunoblot

## CONCLUSÃO

Os ensaios de imunoblot realizados na avaliação da reatividade de soros-controle de bovinos saudáveis e acometidos de cisticercose com o antígeno do líquido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps*

evidenciaram a importância de três peptídeos de baixa massa molecular no diagnóstico da cisticercose nessa espécie. Os referidos peptídeos apresentaram altas taxas de desempenho no imunoblot e foram identificados com as massas moleculares de 4-6, 14 e 18kda. O imunoblot mostrou ser um teste útil no diagnóstico da cisticercose bovina, como já havia sido comprovado no diagnóstico dessa doença em suínos e humanos.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento da respectiva pesquisa.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O projeto de pesquisa que deu origem ao trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 1 - Taxas de desempenho (%) dos principais peptídeos reativos no teste do imunoblot.

Peptídeos (kda)	-----Taxas de desempenho-----				
	S	E	VP+	VP-	C
100-106	77,8	19,2	51,9	55,6	55,6
92-93	11,1	92,3	50,0	50,0	55,6
60-63	22,2	80,8	57,1	51,7	55,6
51-56	33,3	57,7	50,0	50,0	47,2
43-45	16,7	76,9	42,9	48,3	41,7
37-39	44,4	34,6	42,1	41,1	36,1
34-36	72,2	19,2	50,0	50,0	50,0
24-26	38,9	57,7	46,7	47,6	47,2
23	72,2	38,5	59,1	64,3	63,9
18	75,5	97,5	94,7	79,3	84,4
14	87,5	97,5	95,5	88,5	91,6
4-6	66,7	97,5	94,1	74,2	81,2

S: sensibilidade  
 E: especificidade  
 VP+: valor preditivo positivo  
 VP-: valor preditivo negativo  
 C: concordância

**REFERÊNCIAS**

BUENO, E.C. et al. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.1, p.146-151, 2000.

GEKELER, F. et al. Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.21, n.3, p.227-229, 2002. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/b2a0jc92hd3xwdqu/>. Doi: 10.1007/s10096-002-0695-3.

GONZÁLEZ, A. et al. Prevalence and comparison of serologic assays necropsy and tongue examination for the diagnosis for porcine cysticercosis in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, p.194-199, 1990.

GREENE, R.M. et al. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14 and 18kDa related, diagnostic antigens. **Journal of Parasitology**, v.86, n.5, p.1001-1007, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970. Disponível em: http://www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/abs/227680a0.html. Doi: 10.1038/227680a0.

LARRALDE, C. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.40, n.3, p.282-290, 1989.

MINOZZO, J.C. et al. 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, n.3, p.857-864, 2004.

MONTEIRO, L.L. et al. *Taenia solium* metacestode antigens in ELISA for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.21-25, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0102-09352007000100004&tlng=en&lng=en&nrm=iso>. Doi: 10.1590/S0102-09352007000100004.

PATHAK, K.M.L. et al. A Western blot and ELISA assay for the diagnosis of *Taenia solium* infection in pigs. **Veterinary Parasitology**, v.53, p.209-217, 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?\_ob=ArticleURL&\_udi=B6TD7-476VNHM-HM&\_user=687358&\_rdoc=1&\_fmt=&\_orig=search&\_sort=d&view=c&\_acct=C000037899&\_version=1&\_urlVersion=0&\_userid=687358&md5=5fd009cad03af1aa5433cfccf1ac9a4>. Doi: 10.1016/0304-4017(94)90184-8.

PERALTA, R.H.S. et al. Using whole blood collected on filter paper detection of anti-cysticercus antibodies by Elisa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.1-2, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?\_ob=ArticleURL&\_udi=B75GP-4C41S0H-26&\_user=687358&\_rdoc=1&\_fmt=&\_orig=search&\_sort=d&view=c&\_acct=C000037899&\_version=1&\_urlVersion=0&\_userid=687358&md5=565376eff32a84fdebd8ef74abcdbda4>. Doi: 10.1016/S0035-9203(01)90324-4.

PINTO, P.S.A. et al. Immunoblot analysis using antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci in the diagnosis of swine cysticercosis. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.56, n.1-2, p.36-42, 2001.

SATO, M.O. et al. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.309-322, 2003.

TOWBIN, H. et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, p.4350-4352, 1979.

TSANG, V.C.W. et al. An enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay by glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **Journal of Infectious Diseases**, v.159, p. 50-59, 1989.

UNGAR, M.L. et al. Cisticercose bovina. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3.ed. Barueri: Manole, 2008. p.449-461.

VAZ, A.J. et al. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *T. solium* and *T. crassiceps*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.57, p.354-357, 1997.