



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Gleyce Alves Machado

**“Análise de frações antigênicas da forma metacestódea
de *Taenia solium*, obtidas pelo Triton X-114 e por
cromatografia de afinidade, no diagnóstico sorológico
da neurocisticercose humana”**

Uberlândia – MG
2008



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Gleyce Alves Machado

**“Análise de frações antigênicas da forma metacestódea
de *Taenia solium*, obtidas pelo Triton X-114 e por
cromatografia de afinidade, no diagnóstico sorológico
da neurocisticercose humana”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz
Orientadora

Prof. Dr. José Roberto Mineo
Co-orientador

Uberlândia – MG
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- M149a Machado, Gleyce Alves, 1975-
“Análise de frações antigênicas da forma metacestódea de *Taenia solium*, obtidas pelo Triton X-114 e por cromatografia de afinidade, no diagnóstico sorológico da neurocisticercose humana” / Gleyce Alves Machado. - 2008.
110 f. : il.
- Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.
Co-orientador: José Roberto Mineo.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Neurocisticercose - Teses. 2. *Taenia* - Teses. I. Costa-Cruz, Julia Maria.II. Mineo, José Roberto. III.Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.8-008.89

BANCA
FOLHA PIPPA

Esta Tese foi desenvolvida com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Dedicatória

À Deus,

Pelo dom precioso da vida e do discernimento.

Aos meus pais,

*Joaquim Rodrigues Machado e Ivanilde Aparecida Rodrigues, aos quais
devo tudo o que sou.*

Aos meus irmãos,

*Dayse Alves Machado e Wesley Macedo Gomes, pelo carinho e incentivo,
mesmo com a minha ausência devido aos estudos.*

Ao meu marido,

*Flávio Teixeira Alves, por estar sempre comigo. O seu apoio e incentivo
foram indispensáveis na conclusão deste trabalho.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz pela orientação, sugestões e atenção. Dra Julia, acho que nunca conseguirei agradecer tudo o que fez por mim, mas saiba que terá sempre o meu respeito, admiração e eterna gratidão.

Ao Prof Dr. José Roberto Mineo pela co-orientação e imprescindíveis sugestões.

Ao Dr. Leandro Pajuaba de Moura pelo auxílio na obtenção e seleção das amostras biológicas.

À bióloga Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires, pelas inestimáveis sugestões durante toda a minha pesquisa e pelo inigualável exemplo de vida.

À Profa. MSc. Heliana Batista de Oliveira, pela valiosa participação nesta Tese, pela confiança adquirida durante esta trajetória e pela sincera amizade, meu imenso agradecimento.

Ao secretário do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas; João Martins Neto, e a auxiliar administrativa; Luceleide Freitas Queiroz Damásio, pela competência, carisma e atenção.

À secretária Juscélia Marques Alemar do Laboratório de Histologia, pela digitalização das imagens e pelas agradáveis conversas.

A todos os professores da Pós-graduação pela competência e pelo exemplo de dedicação.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Parasitologia pelos inesquecíveis momentos de descontração.

À CAPES, FAPEMIG e UFU pelo auxílio financeiro que foi um fator indispensável para a finalização deste trabalho.

A todos o meu obrigado pelo prazer dos momentos compartilhados!

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1- INTRODUÇÃO	13
1.1 - ASPECTOS MORFOBIOLÓGICOS DE <i>TAENIA SOLIUM</i>	13
1.2 - ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO COMPLEXO TENÍASE-CISTICERCOSE	15
1.3 - ASPECTOS PATOGÊNICOS, INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE NA CISTICERCOSE HUMANA	17
1.4 - FERRAMENTAS NO DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA.....	19
1.4.1 - Critérios clínicos	19
1.4.2 - Dados epidemiológicos	20
1.4.3 - Exames de imagem	20
1.4.4 - Exames do líquido cefalorraquidiano (LCR).....	20
1.4.5 - Exames anatomopatológicos.....	21
1.4.6 - Métodos de imunodiagnóstico.....	21
1.4.6.1 - Extratos antigênicos purificados.....	23
1.4.6.2 - Proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas.....	23
1.4.6.3 - Interações lectina-carboidrato - cromatografia de afinidade.....	24
1.5 - IMPORTÂNCIA DO APERFEIÇOAMENTO DE TÉCNICAS QUE AUXILIEM NO IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE.....	25
2 - OBJETIVOS	27
2.1 – OBJETIVO GERAL	27
2.1.1 – Objetivos específicos	27
3 – MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 - ASPECTOS ÉTICOS E LOCAL DE ESTUDO	28
3.2 - PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DE SORO	28
3.2.1 - Amostras de soro de pacientes com NC	28
3.2.2 - Amostras de soro de pacientes infectados por <i>Taenia</i> sp. e por outros parasitos	29
3.2.3 - Amostras de soro controle de indivíduos saudáveis	30
3.3 - METACESTÓDEOS DE <i>T. SOLIUM</i>	30
3.4 - EXTRATOS ANTIGÊNICOS	30
3.4.1 - Líquido de vesícula	30
3.4.2 - Extrato salino total de metacestódeos de <i>T. solium</i>	30
3.4.3 - Fracionamento do extrato salino total (S) e do líquido de vesícula (LV) através de Triton X-114	31
3.4.4 - Cromatografia de afinidade	33
3.4.4.1 - Cromatografia em Agarose®-Jacalina do extrato salino total (S)	33
3.4.4.2 - Cromatografia em Agarose®-N-acetil-glicosamina do extrato salino total (S).....	35
3.4.4.3 - Cromatografia em coluna de Concanavalina A (ConA) da fração não-ligante de jacalina (FNL-J).....	35
3.5 -ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMOSTRAS ANTIGÊNICAS EM SDS- PAGE 12 %	37
3.6 - COLORAÇÃO DO GEL POR NITRATO DE PRATA	37

3.7 - TESTES SOROLÓGICOS	38
3.7.1 - ELISA - Determinação da titulação do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase	38
3.7.2 - ELISA para detecção de IgG anti-metacésteo de <i>T. solium</i>	38
3.7.3 - <i>Immunoblotting</i> - Determinação da diluição das amostras de soro e da titulação ideal para detecção de IgG anti-metacésteos de <i>T. solium</i>	40
3.7.4 - <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgG anti-metacésteos de <i>T. solium</i>	40
3.8 - NORMAS DE BIOSSEGURANÇA	43
3.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4 – RESULTADOS	45
4.1 – FRACIONAMENTO DO EXTRATO SALINO TOTAL (S) E DO LÍQUIDO DE VESÍCULA (LV) ATRAVÉS DE TRITON X-114	45
4.2 - ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI-METACESTÓDEO DE <i>T. SOLIUM</i> UTILIZANDO O EXTRATO S E O LV E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES PURIFICADAS COM TX-114.....	45
4.3 - <i>IMMUNOBLOTTING</i> PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI-METACESTÓDEO DE <i>T. SOLIUM</i> UTILIZANDO O EXTRATO S E O LV E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES FRACIONADAS COM TX-114	54
4.4 – COMPARAÇÃO DOS EXTRATOS ANTIGÊNICOS TOTAIS E FRACIONADOS	54
5- DISCUSSÃO	79
6- CONCLUSÕES	84
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO	102
Artigo Científico referente à Tese publicado em periódico internacional (TM&IH - fator de impacto: 2.595)	

RESUMO

A neurocisticercose (NC) causada pela forma metacestódea de *Taenia solium* freqüentemente acomete o sistema nervoso central podendo ser confundida com outras síndromes neurológicas. O diagnóstico sorológico da NC é de grande importância na rotina laboratorial porque auxilia no diagnóstico de pacientes que apresentam sinais clínicos e radiológicos compatíveis com esta doença. A utilização de antígenos purificados tem permitido o desenvolvimento de testes mais sensíveis e específicos, resultando em estudos soroepidemiológicos e de triagem mais confiáveis. Processos de purificação antigênica utilizando Triton X-114 (TX-114) e cromatografia de afinidade consistem em técnicas simples e de baixo custo. O objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar diferentes frações antigênicas da forma metacestódea de *T. solium* obtidos por separação de fases usando TX-114 e cromatografia de afinidade para o sorodiagnóstico da NC humana. Foram analisadas 132 amostras de soro, sendo 40 de pacientes com NC, 62 de pacientes com outras parasitoses e 30 de indivíduos aparentemente saudáveis. O extrato salino total (S) e o líquido de vesícula (LV) foram submetidos ao processo de fracionamento utilizando TX-114 para a obtenção das frações antigênicas: detergente (DS e DLV, respectivamente) e aquosa (AS e ALV, respectivamente). O extrato S foi purificado em colunas de jacalina e N-acetilglicosamina, sendo apenas a fração não ligante de jacalina (FNL-J) submetida à coluna de concanavalina A (ConA) e fracionamento com TX-114. Todos antígenos foram analisados em SDS-PAGE 12% e corados pela prata para visualização das bandas antigênicas. As amostras de soro foram avaliadas para detecção de IgG pelo teste ELISA na diluição de 1:200 e pelo *immunoblotting* na diluição de 1:100. Sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico e Índice de Youden foram calculados para o teste ELISA. As sensibilidades e especificidades dos testes ELISA foram: 92,5% e 84,8% (S); 92,5% e 92,4% (DS); 67,5% e 70,6% (AS); 82,5% e 85,9% (LV); 77,5% e 72,8% (DLV); 80,0% e 80,4% (ALV); 85,0% e 84,8% (FNL-J); 92,5% e 93,5% (DFNL-J); 82,5% e 82,6% (AFNL-J), respectivamente. A eficiência do diagnóstico e o Índice de Youden dos testes ELISA foram: 87,1% e 0,77 (S); 92,4% e 0,85 (DS); 69,7% e 0,38 (AS); 84,8% e 0,68 (LV); 74,2% e 0,50 (DLV); 80,3% e 0,60 (ALV); 84,8% e 0,70 (FNL-J); 93,2% e 0,86 (DFNL-J); 82,6% e 0,65% (AFNL-J), respectivamente. No *immunoblotting* a banda de 70-50 kDa foi detectada em todas as amostras de soro de pacientes com NC para a fração DFNL-J, enquanto nenhuma reatividade foi observada para esta fração antigênica nas amostras de pacientes com outras parasitoses ou indivíduos saudáveis. Concluindo, a fração DFNL-J foi mais sensível e específica que os outros extratos, sendo capaz de diferenciar pacientes com NC daqueles com outras parasitoses, particularmente nas infecções por *Echinococcus granulosus*.

Palavras-chaves: *Taenia solium*, Triton X-114, Cromatografia de afinidade, Diagnóstico, Neurocisticercose.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NC) caused by *Taenia solium* metacestodes usually affects the central nervous system and can be confused with other brain pathologies. The serological diagnosis of NC is of great importance in routine clinical management of patients because it supports the diagnosis in patients that have clinical and radiological findings compatible with this disease. The use of purified antigens has allowed the development of more sensitive and specific tests, resulting in reliable seroepidemiological and screening studies. Purification procedures using Triton X-114 (TX-114) and affinity chromatography are simple and low cost methods. The aim of this study was to characterize and to compare different antigenic fractions from crude saline extract of *T. solium* metacestodes obtained by phase partitioning using TX-114 and affinity chromatography for the serodiagnosis of human NC. A total of 132 serum samples were analyzed, from which 40 were of patients with NC, 62 were of patients with other parasitic diseases and 30 were from apparently healthy individuals. The crude saline extract (S) and the cyst vesicular fluid (VF) were submitted to phase partitioning using TX-114, resulting in following fractions: detergent (DS and DVF, respectively) and aqueous (AS and AVF, respectively) phases. The extract S was purified in jacalin or N-acetyl-glucosamine columns, but only the jacalin-unbound fraction was then submitted to Concanavalin A column or TX-114 partitioning. All antigens were analyzed in SDS-PAGE 12% and antigen bands were visualized by silver staining. Serum samples were evaluated for IgG detection at 1:200 dilution for ELISA and 1:100 dilution for immunoblotting. Sensitivity, specificity, diagnostic efficiency and Youden Index were calculated for ELISA. ELISA sensitivity and specificity were 92.5% and 84.8% (extract S); 92.5% and 92.4% (DS); 67.5% and 70.6% (AS); 82.5% and 85.9% (VF); 77.5% and 72.8 (DVF); 80.0 and 80.4% (AVF); 85.0% and 84.8% (jacalin-unbound fraction); 92.5% and 93.5% (Detergent jacalin-unbound fraction); 82.5% and 82.6 % (Aqueous jacalin-unbound fraction), respectively. ELISA diagnostic efficiency and Youden Index were: 87.1% and 0.77 (extract S); 92.4% and 0.85 (DS); 69.7% and 0.38 (AS); 84.8% and 0.68 (VF); 74.2% and 0.50 (DVF); 80.3% and 0.60 (AVF); 84.8% and 0.70 (jacalin-unbound fraction); 93.2% and 0.86 (Detergent jacalin-unbound fraction); 82.6% and 0.65 (Aqueous jacalin-unbound fraction), respectively. By immunoblotting, all serum samples from NC patients recognized a 70-50 kDa band in the detergent jacalin-unbound fraction whereas no reactivity for this antigenic fraction was observed in serum samples from patients with other parasitoses or healthy individuals. In conclusion, the detergent jacalin-unbound fraction showed to be more sensitive and specific than other extracts, since it was able to discriminate NC patients from other parasitoses, particularly *Echinococcus granulosus*-infected patients.

Keywords: *Taenia solium*; Triton X-114; Affinity chromatography; Diagnosis; Neurocysticercosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Fração aquosa
AFNL-J	Fração aquosa da fração não ligante de jacalina utilizando o extrato salino total
ALV	Fração aquosa do líquido de vesícula
AS	Fração aquosa do extrato salino total
ConA	Concanavalina A
D	Fração detergente
DAB	Diaminobenzidina
DFNL-J	Fração detergente da fração não ligante de jacalina
DO	Densidade óptica
DS	Detergente do extrato salino total
DLV	Fração detergente do líquido de vesícula
ED	Eficiência do diagnóstico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FL-ConA	Fração da FNL-J ligante de Concanavalina A
FL-J	Fração do extrato salino total ligante de Jacalina
FL-N	Fração do extrato salino total ligante de N-acetil-glicosamina
FNL-ConA	Fração do extrato FNL-J não ligante de Concanavalina A
FNL-J	Fração do extrato S não-ligante de Jacalina
FNL-N	Fração do extrato S não-ligante de N-acetil-glicosamina
GP	Glicoproteínas
Grupo 1	Pacientes com NC
Grupo 2	Pacientes infectados por <i>Taenia</i> sp. e por outros parasitos
Grupo 3	Indivíduos saudáveis
IgG	Imunoglobulina G
IR	Índice de reatividade
IY	Índice de Youden
kDa	Kilodaltons
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LV	Líquido de vesícula
mg	Média geométrica
NC	Neurocisticercose
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde

OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-TM	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e leite desnatado
RM	Ressonância magnética
RX	Raio X
S	Extrato salino total
SDS	Sulfato duodecil de sódio
SDS-PAGE	SDS- <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNC	Sistema nervoso central
Ta	Temperatura ambiente
TC	Tomografia computadorizada
TG-ROC	<i>Two-graph receiver operating characteristic</i>
Tris	Tris[Hidroximetil]aminometano
Tris-HCl	Solução de Tris adicionada de HCl
Tween-20	Polioxietilensorbitano-monolaurato
TX-114	Triton X-114
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

1 – INTRODUÇÃO

A neurocisticercose (NC) humana, infecção do sistema nervoso central (SNC) pela forma metacestódea de *Taenia solium*, constitui uma das principais causas de epilepsia e distúrbios neurológicos em diversos países do mundo (FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

A teníase é provocada pela presença da forma adulta de *T. solium* ou de *Taenia saginata* no intestino delgado humano, enquanto a cisticercose é provocada pela presença da forma metacestódea ou cisticerco nos tecidos dos seus hospedeiros intermediários. A teníase e a cisticercose são conhecidas desde a antiguidade, pensando-se durante muito tempo que se tratavam de doenças causadas por espécies diferentes de parasitos, até que Küchenmeister, em 1885, demonstrou que o cisticerco do suíno dá origem à tênia no homem (PAWLOWSKI, 1972; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

O homem além de ser o hospedeiro definitivo de *T. solium* ainda pode ocasionalmente ser infectado pelos ovos deste parasito desenvolvendo assim a cisticercose, cuja sintomatologia dependerá dos locais de instalação e desenvolvimento dos cisticercos. A gravidade do parasitismo por *T. solium* em relação à infecção por *T. saginata* decorre do fato do homem ser tanto hospedeiro definitivo quanto hospedeiro intermediário (VIANNA; MACEDO; COSTA, 1991; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

1.1 – ASPECTOS MORFOBIOLÓGICOS DE *TAENIA SOLIUM*

O parasito *T. solium* pertence à Família Taeniidae (filo Platyhelminthes, classe Cestoidea e ordem Cyclophyllidea) e se caracteriza por ausência completa do aparelho digestivo, segmentação do corpo em proglotes, dotadas cada uma de um sistema reprodutor hermafrodita; úteros em forma de tubos longitudinais ramificados, testículos numerosos e poros genitais situados nas margens das proglotes com disposição irregular (PAWLOWSKI, 1972).

A tênia adulta localiza-se no intestino delgado humano, sendo composta por cabeça ou escólex contendo quatro ventosas e uma dupla coroa de ganchos ou acúleos, um colo estreito e o corpo. Os acúleos possibilitam melhor adesão e maior penetração do escólex entre as vilosidades intestinais (DEL BRUTTO; SOTELO, 1993). O corpo pode medir até cinco metros de comprimento sendo formado por proglotes hermafroditas, que variam de 800 a 900 por parasito. Estas diferenciam em proglotes jovens, maduras e grávidas, sendo que

cada proglote grávida contém aproximadamente 50.000 ovos que são resistentes à dessecação, podendo sobreviver meses na terra ou na água. Os ovos, esféricos, medindo 30 a 35 µm de diâmetro, são constituídos por um embrião hexacanto ou oncosfera, providos de três pares de acúleos e envoltos por uma espessa membrana protetora denominada embrióforo. Estes ovos, uma vez ingeridos, sofrem a ação de enzimas digestivas (pepsina e tripsina) liberando os embriões hexacantos que são ativados pela ação da bile e atravessam a parede intestinal. Os embriões atingem a corrente sangüínea e são transportados a todos os órgãos e tecidos do organismo, alcançando assim a fase de *Cysticercus cellulosae* (Malpighi, 1697) ou *Cysticercus solium* chamada de forma metacestódea de *T. solium* ou cisticerco. Ao fim de 60 a 75 dias esta forma já é infectante para o homem, porém permanece viável na musculatura do suíno durante vários anos (PÊSSOA; MARTINS, 1982; DEL BRUTTO; SOTELO, 1993; REY, 2001a).

Ocasionalmente o homem pode adquirir a cisticercose através da ingestão de água ou verduras foliáceas contaminadas com ovos; ou pela auto-infecção interna em consequência de movimentos antiperistálticos ou de vômitos, onde algumas proglotes grávidas podem alcançar o estômago, ou também pela auto-infecção externa, em que o próprio portador da tênia, ingere os ovos de *T. solium* que ele alberga em consequência dos maus hábitos higiênicos e a eventualidade de levar as mãos à boca (REY, 2001b; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

Os embriões alojam-se em qualquer tecido (pele, músculos esqueléticos e cardíacos, olhos, cérebro, etc.) embora exista uma preferência pelos tecidos de maior movimentação e com maior oxigenação (masseter, língua, coração e cérebro). Os metacestódeos apresentam-se como uma vesícula globosa ou alongada, conforme a pressão dos tecidos sobre ele, podendo medir até 15mm de comprimento por 7 ou 8 mm de largura. (TAY, 1972; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006). O homem uma vez ingerindo carne suína, crua ou mal cozida, infectada com estes embriões adquire a teníase. No tubo digestivo do homem, os embriões são liberados através da digestão da carne e sob a ação da bile, onde desenvaginam o escólex e as ventosas fixam-se à mucosa do intestino delgado. O rostro eleva-se entre as vilosidades do jejuno, onde ancora firmemente os seus acúleos, após esta fase tem se início o crescimento da tênia (TAY, 1972; DEL BRUTTO; SOTELO, 1993).

Entre 60 e 70 dias após a ingestão de carne contendo metacestódeos, os pacientes eliminam as primeiras proglotes de *T. solium*, ocasião na qual o helminto já mede aproximadamente dois metros de comprimento. Somente o homem tem sido encontrado com

infecção natural pela *T. solium*, ainda que experimentalmente tenha sido possível infectar algumas espécies de primatas, além de haver relatos de sucesso na infecção experimental de hamsters imunossuprimidos (ALLAN et al. 1991; WANG et al. 1999). Além do homem, o macaco, o urso negro, o cão e o gato também já foram descritos como hospedeiros intermediários acidentais de *T. solium* (THEIS et al., 1996; REY, 2001b; SCHWAN et al. 2002; SILVA et al., 2004).

1.2 – ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO COMPLEXO TENÍASE-CISTICERCOSE

O complexo teníase-cisticercose constitui uma zoonose fonte de preocupação para profissionais da área de saúde humana e animal, no entanto não há um programa de controle efetivo por parte dos órgãos governamentais (VALADARES, 1997). Este complexo está relacionado com fatores extrínsecos como temperatura ambiente, umidade e agentes dispersores dos ovos; fatores intrínsecos como potencial biótipo do parasito e imunidade natural e adquirida dos hospedeiros, além de fatores socioeconômicos como práticas de criação de suínos, comportamentos alimentares dos hospedeiros, legislação, fiscalização e nível de educação sanitária da população (PEDRETTI JUNIOR et al., 1997; SCIUTTO et al., 2000; CARPIO, 2002; GONZÁLEZ et al., 2003; SUDEWI et al., 2008).

Após encontro internacional sobre *T. solium* e o complexo teníase-cisticercose, com especial foco no leste e sul da África, realizado em Arusha, Tanzânia – África, em agosto de 2002, vários autores reafirmaram o problema de saúde pública da teníase-cisticercose na América Latina, Ásia e África Central e Ocidental. Esta reunião ainda demonstrou que este parasito encontra-se difundido também na África Oriental e Meridional (DORNY et al, 2003; MAFOJANE et al., 2003; MUKARATIRWA et al., 2003; PHIRI et al., 2003; SARTI, RAJSHEKHAR, 2003; ZOLI et al., 2003).

No continente americano a teníase e a cisticercose são prevalentes e encontram-se prevalente na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guatemala, México e no Peru. O complexo teníase-cisticercose constitui um problema na Argentina, Chile, Costa Rica, Haiti, Panamá, República Dominicana e na Venezuela, mas a transmissão é esporádica. Em alguns países deste continente são registrados apenas casos importados, com no caso do Canadá, Cuba, Guiana Francesa, Jamaica, Paraguai, Suriname e Trinidad e Tobago (ANTONIUK, 1999).

A soroprevalência da cisticercose em pacientes epiléticos da Nicarágua, foi avaliada através de questionário epidemiológico e testes imunológicos, os resultados demonstraram que esta parasitose pode ser endêmica e significativamente responsável pela maioria dos casos de epilepsia relatados na região (BUCARDO et al., 2005).

Na América do Norte, através de um estudo de soroprevalência da cisticercose e teníase por *T. solium* DeGiorgio et al. (2005) alertaram para o risco oferecido por estas doenças na Califórnia, nos Estados Unidos, onde a prevalência para cisticercose e teníase foi de 1,8 % e 1,1 %, respectivamente.

Em um estudo realizado em Honduras, quanto à prevalência, incidência e etiologia da epilepsia, a NC demonstrou ser a causa principal desta sintomatologia, representando 62% dos casos analisados (MEDINA et al., 2005).

A Organização Panamericana de Saúde (OPAS) juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) consideram como endêmicos os índices de 1% para teníase, 0,1% para cisticercose humana e 5% para cisticercose animal, mas a inexistência da notificação compulsória da cisticercose na América Latina constitui um obstáculo para o planejamento de estratégias de prevenção (OPAS, 1994). Diante desta situação alguns autores sugeriram que a NC se tornasse uma doença de notificação obrigatória internacional visando o conhecimento da atual situação em que se encontra esta parasitose (TAKAYANAGUI et al., 1996; ROMÁN et al., 2000).

No Brasil, a prevalência de cisticercose humana nas diversas regiões geográficas foi estimada em um estudo soroepidemiológico, desenvolvido no Laboratório de Cisticercose da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em amostras de indivíduos residentes em Brasília, DF. Através de diagnóstico imunológico detectaram-se índices de positividade que variaram entre grupos naturais de diversas regiões do país, sendo 8,1% na região Sudeste; 5,8% no Nordeste; 5,3% no Centro-Oeste e 3,5% no Sul do país (VIANNA et al., 1986).

No período de 1985 a 1990, em estudo prospectivo, no Hospital Escola da Faculdade de Medicina da UFU, foram diagnosticados 10 casos de NC em crianças de 4 a 13 anos de idade (FERREIRA et al., 1994). Em um outro estudo, retrospectivo, Costa-Cruz et al. (1995) investigaram a prevalência de cisticercose humana através de 3.937 ocorrências de necropsias no período de 1971 a 1993 no serviço de anatomia patológica do mesmo hospital. A análise de 2.862 registros de laudos que estavam completos e com idade acima de um ano revelou 39 casos (1,4%) de cisticercose. Com relação à procedência, 82,1% eram do Estado de Minas Gerais, 15,4% de Goiás e um caso (2,5%) não foi possível identificação. Dos 39 casos, 35 (89,7%) apresentaram comprometimento do SNC, isolado ou associado a outras formas clínicas da doença, nove revelaram a forma cardíaca (isolada ou associada), quatro a forma muscular (isolada ou associada) e em quatro a forma visceral (isolada ou associada). Os dados obtidos ainda informaram que em sete casos (17,9%) a cisticercose foi a causa básica do óbito.

Em pesquisa para detectar anticorpos IgG anti-metacésteo de *T. solium* em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia, um total de 1133 amostras de soro foram analisadas pelo teste de imunofluorescência indireta e o ELISA no Laboratório de Cisticercose da Universidade Federal de Uberlândia. A soropositividade foi de 5,6%, mostrando diferenças de acordo com suas cidades de origens: Araguari (13,5%), Tupaciguara (5,0%), Monte Alegre de Minas (4,8%) e Uberlândia (4,7%) (SILVEIRA-LACERDA et al., 2002).

Em estudo descritivo e retrospectivo de pacientes do Estado do Ceará a prevalência de NC estimada foi de 1,01caso/100.000hab, mas os autores consideraram que os resultados foram subestimados, devido à ausência dos exames de imagem recomendados (FAÇANHA, 2006).

1.3 – ASPECTOS PATOGÊNICOS, INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE NA CISTICERCOSE HUMANA

A cisticercose humana pode adquirir caráter de doença crônica grave, por suas manifestações, seqüelas ou alta mortalidade. As manifestações clínicas somente são observadas quando as oncosferas alcançam o ponto de fixação, começando então o processo patogênico, devido à dois fatores principais: o primeiro seria observado pela compressão mecânica e o deslocamento de tecidos ou estruturas, decorrentes do crescimento do metacésteo, podendo obstruir o fluxo normal de líquidos orgânicos, como o LCR; o segundo pelo processo inflamatório que geralmente envolve o parasito e que pode, eventualmente, estender-se às estruturas vizinhas (WHITE Jr, 2000; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

Não existe uma sintomatologia própria ou um quadro único que diferencie a cisticercose de outras doenças, sendo assim é considerada uma doença polimorfa, com os mais diversos quadros clínicos decorrentes das diferentes localizações do parasito, número, tamanho e estágio evolutivo do cisticerco, além das respostas imune-inflamatórias do hospedeiro ao parasito (GARCIA; DEL BRUTTO, 2000; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006). A NC não possui sintomatologia característica, podendo ser confundida com outras síndromes neurológicas. As apresentações clínicas mais freqüentes são: epilepsias, hipertensão intracraniana (hidrocefalia ou pseudotumoral), demência, meningítica e medular, isoladas ou associadas, doença de “Parkinson” (CANELAS, 1962; ANDRIANTSIMAHAVANDY et al., 1997; SANCHEZ; LJUNGSTRÖM; MEDINA, 1999; ANTONIUK et al., 2001; BOPPRE et al., 2001; VANDENBOS et al., 2002; SA et al., 2005), além de outros sintomas como tonturas, convulsões, déficit motor, movimentos involuntários

e distúrbios comportamentais (LONARDONI et al., 1996; CUÉLLAR et al., 1999; ROCHA et al., 2001; HAMED, EL-METAAL, 2007), crises depressivas (FORLENZA et al., 1998) e cefaléia (SOUSA et al., 1998). No caso da forma racemosa, onde a localização habitual do parasito é o espaço subaracnóide, sendo mais freqüente nas cisternas basais e na convexidade cerebral, são observadas meningites crônicas e aracnoidites (NASH; NEVA, 1984; BANNUR; RAJSHEKHAR, 2001; ADITYA et al., 2004).

Além do acometimento do SNC existem relatos de maciça infecção da musculatura estriada originando quadro clínico de pseudo-hipertrofia miopática (TAKAYANAGUI; CHIMELLI, 1998), presença de cisticercos em tecido muscular cutâneo (VIANNA; MACEDO; COSTA, 1991), nervos periféricos (CANELAS, 1963), musculatura estriada formando nódulos que são diagnosticados inicialmente como pseudotumores (OGILVIE et al., 2001). Existem também relatos de cisticercos nos pulmões (WALTS; NIVATPUMIN; EPSTEIN, 1995), fígado (SICKEL et al., 1995), musculatura cardíaca (LINO JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 1999), mama (ABREU-E-LIMA et al., 1999), cavidade oral (MAZHARI; KUMAR; JAIN, 2001; DELGADO-AZAÑERO et al., 2007; JAY et al., 2007), órbita ocular (GURHA et al., 1999; LOMBARDO, 2001; PUSHKER; BAJAJ; BETHARIA, 2002; SHARMA et al., 2003; CORTEZ et al., 2007), musculatura extraocular (PANDEY; CHAUDHURI; BHATIA, 2001; GAMANAGATTI; SRIVASTAVA; VENKATESH, 2003; ANGOTTI-NETO et al., 2007), além da forma disseminada (MAMERE et al., 2004; PUSHKER, BAJAJ, BALASUBRAMANYA; 2005).

Quanto à interação parasito-hospedeiro o exame histológico do cisticercos revela uma superfície lisa, uma camada cuticular eosinofílica, uma camada celular e muscular e uma frouxa camada reticular inferior. No caso de parasitos viáveis, observa-se pequena inflamação circundando o parasito, geralmente consistindo de áreas com linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, ou seja quando a inflamação está presente, esta costuma ser de tipo celular e crônica. Pode haver zonas de necrose nas mediações, onde os vasos apresentam vascularites, infiltração perivascular de linfócitos, fibrose e proliferação endotelial com estreitamento ou obliteração da luz dos vasos. A ausência ou reduzida inflamação é resultado da secreção de serina proteases, que inibem a ativação do complemento, a ativação de linfócitos e a produção de citocinas, com destaque para as interleucinas IL2, IL5 e IL10 (RODRIGUES Jr et al., 2000; WHITE Jr, 2000; BUENO et al., 2004; CASTILLO-IGLESIAS et al., 2006).

A resposta inflamatória se torna mais evidente quando os parasitos estão em fase de degeneração, observando-se primariamente linfócitos, mas também alguns neutrófilos e eosinófilos (ROBINSON et al., 1997; GREWAL et al., 2000; RESTREBO et al., 2001).

Na resposta humoral destacam-se os anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*, que são detectados tanto em amostras de soro quanto em amostras do LCR, além de serem encontrados em níveis superiores às demais classes de imunoglobulinas em diferentes amostras biológicas (SHORT et al., 1990; BUENO et al., 2000; PARDINI et al., 2002). A NC ativa é caracterizada pela elevação dos níveis de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgE, and IgA, respectivamente em ordem decrescente quanto aos níveis detectáveis. Os maiores valores são detectados em casos de cisticercose intraventricular e em casos de múltiplas manifestações (ODASHIMA; TAKAYANAGUI; FIGUEIREDO, 2002).

O estudo do parasito e da resposta imune do hospedeiro tem despertado interesse de diversos pesquisadores, ainda que existam muitas questões sem respostas, principalmente nos casos assintomáticos de NC (FLISSER et al., 1986; PITELLA, 1997; TORRES; ISTÚRIZ, 1997; CARPIO; ESCOBAR; HAUSER, 1998).

1.4 - FERRAMENTAS NO DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA

O desenvolvimento de técnicas de imunodiagnóstico tem contribuído com significativa importância nos estudos soropidemiológicos, juntamente com os vários exames complementares que são indispensáveis no diagnóstico da NC (DORNY et al., 2003). A observação de diversos dados, assim como a clínica, a epidemiologia e os exames complementares (neuroimagem, neurofisiológicos, anatomopatológicos e métodos imunológicos) tem sido amplamente empregados no auxílio diagnóstico da NC, uma vez que estes dados em conjunto podem definir o quadro clínico de um paciente (DEL BRUTTO et al., 1996; VAZ; LIVRAMENTO, 1996; DEL BRUTTO et al., 2001; GARCIA et al., 2005; HAWK et al., 2005; LIMA et al., 2006).

Novos conceitos no diagnóstico desta parasitose tem sido aperfeiçoados nos últimos anos; dentre os quais destaca-se a identificação e sequenciamento de antígenos específicos e o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais de diagnóstico (GARCIA et al., 2005).

1.4.1 – Critérios clínicos

As manifestações clínicas sugestivas são geralmente: epilepsia, demência e hipertensão intracraniana (YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE, 2005; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006; VELASCO et al., 2006). A cisticercose oftalmológica também resulta em grande preocupação, embora seja bem menos comum que a NC, ocorrendo entre 1 e 3%

das infecções, sendo observados distúrbios visuais e até perda da visão (GARCIA et al., 2003).

1.4.2 – Dados epidemiológicos

Os dados epidemiológicos agrupam informações quanto à origem do paciente, área geográfica em que reside ou residia, hábito de viajar para regiões endêmicas e também se tem ou teve contato com portadores da infecção por *T. solium* e ingerir carne crua ou mal cozida e verduras foliáceas (FLISSER et al., 2003).

1.4.3 – Exames de imagem

Uma vez que o número, tamanho, viabilidade e localização das lesões são de fundamental importância, os exames de imagem representam importante papel no diagnóstico da NC. A demonstração radiológica através de raio X (RX) é feita pelo encontro de imagens dos nódulos calcificados, com aspecto mais ou menos característico. A ultra-sonografia é útil no exame de cisticercose ocular. A tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) permitem a visualização de estruturas do parasito e do processo reacional do hospedeiro (DEL BRUTTO et al., 1996; CASTILLO, 2004; YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE, 2005; GARG et al., 2007). Embora os resultados destes exames de imagens sejam tão importantes no diagnóstico da NC, tanto a TC quanto a RM ainda há limitações quanto ao seu uso devido ao alto custo financeiro (CHAWLA et al., 2002; GARCIA; DEL BRUTTO, 2003; GARCIA et al., 2003; HAWK et al., 2005; DUA; ANEJA, 2006).

1.4.4 - Exames do líquido cefalorraquidiano (LCR)

O exame do LCR fornece um grande número de informações para o diagnóstico da NC, uma vez que a geralmente a cisticercose determina alterações do LCR, com características que sugerem processo inflamatório crônico. As alterações a serem observadas dependerão de vários fatores, como a localização do cisticercos, assim como a sua viabilidade e também da resposta do organismo ao parasito. Mas, é possível observar um quadro liquórico normal: nos casos de cisticercos calcificados ou reabsorvidos ou quando a sua localização não exercer influência sobre a constituição do LCR (SPINA-FRANÇA et al., 1977; SPINA-FRANÇA; LIVRAMENTO; MACHADO, 1993).

1.4.5 - Exames anatomopatológicos

Os nódulos subcutâneos, eventualmente encontrados nos pacientes, permitem que se proceda facilmente a uma biópsia, assim o exame do cisticerco ao microscópio permite o exame histopatológico (MAHAJAN; KHURANA; SETIA, 2007).

1.4.6 – Métodos de imunodiagnóstico

Vários métodos imunológicos foram descritos para a pesquisa de anticorpos na cisticercose humana:

Reação de fixação de complemento também chamada de reação de Weinberg, foi o primeiro teste a ser utilizado sistematicamente no diagnóstico da NC. A sensibilidade é de aproximadamente 70%, variando de acordo com o antígeno e o protocolo utilizado (WEINBERG, 1909).

Imunofluorescência indireta foi introduzida na década de 70 trazendo novas perspectivas diagnósticas. Este método tem apresentado sensibilidade superior a 85%, mas com menor sensibilidade em amostras de LCR hemorrágicas (MACHADO; CAMARGO; HOSHINO, 1973).

Hemaglutinação indireta apesar da simples execução e baixo custo, tem sido criticada pela dificuldade de obtenção de lotes homogêneos e estáveis de hemácias sensibilizadas (LARRALDE et al., 1986).

Radioimunoensaio devido ao custo elevado e riscos que oferece não teve seu uso difundido no diagnóstico da NC (MILLER et al., 1984).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) técnica de execução muito simples e rápida, tendo sido utilizada devido sua alta sensibilidade e especificidade. Pode ser usada com processos automáticos de leitura dos testes, fato de grande interesse nos inquéritos soroepidemiológicos. Nesta técnica deve-se salientar que com extratos totais ela é menos sensível e menos específica (COSTA et al., 1982; COSTA-CRUZ, 1995; VAZ; LIVRAMENTO, 1996). O ELISA-“conta” e o dot-ELISA também são indicados no diagnóstico da cisticercose (VAZ et al., 1990; SILVA et al., 2000).

Immunoblotting, técnica que tem apresentado diferentes índices de sensibilidade e especificidade, muitas vezes em função da preparação antigênica, do tipo e gravidade das lesões, da reação inflamatória envolvendo o parasito e da amostra biológica utilizada (GOTTSTEIN; TSANG; SCHANTZ, 1986; TSANG; BRAND; BOYER, 1989; SHIGUEKAWA et al., 2000; BARCELOS et al., 2001).

Dentre todos os métodos imunológicos o ELISA tem sido o ensaio mais estudado no diagnóstico da NC por apresentar significativa sensibilidade e especificidade, fácil e simples execução e baixo custo. Recomenda-se empregar dois testes imunológicos, sendo um de elevada sensibilidade e outro bastante específico, para maior segurança na interpretação dos resultados (COSTA-CRUZ, 1995; VAZ; LIVRAMENTO, 1996).

No Brasil, Costa et al. (1982) introduziram o ELISA em amostras de LCR para pesquisa de anticorpos IgG, utilizando três antígenos da forma metacestódea de *T. solium* (líquido de vesícula, extrato salino e extrato alcalino), relatando índices de sensibilidade e especificidade próximos à 100%. Este teste também foi padronizado no LCR para anticorpos IgM, utilizando o extrato glicoprotéico (polissacarídico) da forma metacestódea de *T. solium* (COSTA et al., 1985). A utilização desta amostra biológica tem resultado em índices de sensibilidade próximos a 90% e uma redução nos resultados inespecíficos (COSTA, 1986; BASSI et al., 1991; SALINAS et al., 1996).

Quanto à sensibilidade e especificidade de diferentes anticorpos no teste ELISA, foi possível verificar em amostras de LCR que o anticorpo IgG apresenta maior sensibilidade no diagnóstico da NC frente a outras imunoglobulinas [88,5% (IgG); 39,5% (IgM); 25,6% (IgE) e 16,3% (IgA)], mas isto não foi verificado quanto à especificidade, pois não houve diferença entre as classes de imunoglobulinas [93,2% (IgG); 95,2% (IgM e IgE) e 97,6% (IgA)] (ODASHIMA; TAKAYANAGUI; FIGUEIREDO, 2002).

Embora amostras de LCR apresentem excelente utilidade no imunodiagnóstico da NC em relação às amostras de soro, a colheita de LCR é um procedimento invasivo que requer profissional especializado em local adequado (MACEDO et al., 2002; PUCCIONI-SOHLER et al., 2002). A utilização de amostras de soro em testes utilizando extratos totais tem apresentado baixos índices de especificidade (BARCELOS et al., 2005; MACHADO et al., 2007).

O *immunoblotting* tem sido utilizado no estudo da NC observando diferentes índices de sensibilidade e eficiência, muitas vezes em função dos extratos antigênicos utilizados e da forma da doença, onde uma menor eficiência é observada na forma calcificada e em casos de um único cisticerco (PROAÑO-NARVAEZ et al., 2002; VILLOTA et al., 2003).

A reação de *Immunoblotting* e o teste ELISA apresentam diferenças quanto à sensibilidade e especificidade, porém a importância dos dois testes é salientada, principalmente nos casos em que os métodos diagnósticos de neuroimagens não são acessíveis (PRABHAKANAN et al., 2004).

1.4.6.1 – Extratos antigênicos purificados

Os extratos antigênicos totais são amplamente utilizados em estudos soroepidemiológicos em áreas endêmicas, mas a identificação e purificação de glicoproteínas são o principal objetivo da maioria dos estudos sorológicos no diagnóstico da NC (ITO, 2002; DORNY et al., 2003; PRABHAKARAN et al., 2004; BUENO et al., 2005), uma vez que o uso de diferentes extratos antigênicos totais da forma metacestódea de *T. solium* (extrato salino total, líquido de vesícula e extrato alcalino total) resultam em diferenças significantes nos testes imunológicos (COSTA, 1986).

Várias técnicas de purificação já foram descritas, nas quais as taxas de sensibilidade e especificidade ficaram próximas a 100% (ITO et al., 1998; KO; NG, 1998; PARDINI et al., 2002; DEKUMYOY et al., 2004; BUENO et al., 2005; YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE, 2005; SAKO et al., 2006; SATO et al., 2006; ASSANA et al., 2007).

O uso de peptídeos purificados tem demonstrado ótimos resultados nas diversas áreas de imunodiagnóstico, onde estão sendo considerados excelentes candidatos a antígenos pelos altos índices de sensibilidade e especificidade, além de demonstrarem pouquíssima reatividade cruzada. Com isso, peptídeos sintéticos vêm ser uma área de pesquisa promissora tanto para uso em testes imunológicos quanto no desenvolvimento de vacinas (GEVORKIAN et al., 1996; GAUCI; LIGHTOWLERS, 2001; FERRER et al., 2003; SAKO et al., 2006).

1.4.6.2 – Proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas

As proteínas podem ser hidrofílicas ou hidrofóbicas. A grande maioria das moléculas orgânicas encontradas em sistemas vivos possui natureza hidrofílica, podendo se difundir na célula ou serem transportadas por fluidos dentro de um organismo, associadas ou não à outras moléculas. Quando possuem zonas hidrofóbicas expostas ao solvente, estão normalmente associadas à membranas, podendo ter áreas expostas ao meio aquoso intracelular, extracelular ou a ambos, deste modo, as proteínas integrais são moléculas que possuem uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica (STRYER et al., 2004).

Técnicas de fracionamento utilizando Triton X-114 (TX-114) envolvem procedimentos simples e capazes de separar proteínas com características hidrofílicas de proteínas hidrofóbicas (ANDERSEN; MOLLER, 1998; BRICKER et al., 2001; CHATURVEDI; GUPTA, 2001; COLLÉN et al., 2002; HÉNAFF; CRÉMET; FONTENELLE, 2002; MANZOORI; BAVILI-TABRIZI, 2002; MACHADO et al., 2007). Visando melhorar ainda mais os resultados, uma vez que proteínas hidrofílicas e proteínas hidrofóbicas possuem características distintas quanto ao reconhecimento de anticorpos, técnicas mais sofisticadas na

purificação de antígenos a partir de produtos da extração com TX-114, tem demonstrando com isto sensibilidade e especificidade em taxas próximas a 100% (HANCOCK et al., 2004).

A solução detergente TX-114 é um produto que possui forma homogênea a 0°C, mas com possibilidade de separar-se em fase aquosa e fase detergente em temperaturas superiores a 20°C. Durante o processo de purificação as proteínas hidrofílicas são encontradas exclusivamente na fase aquosa e as proteínas integrais de membrana são recuperadas na fase detergente (BORDIER, 1981; MACHADO et al., 2007).

1.4.6.3 – Interações lectina-carboidrato - Cromatografia de afinidade

As lectinas são conhecidas pela propriedade de interagirem com açúcares, fato que as tornam úteis na purificação de glicoproteínas solúveis e de membranas. Esta característica tem sido bastante explorada na imunologia e na glicobiologia, sendo utilizadas no isolamento e purificação de glicoconjugados por cromatografia de afinidade (SCRIBA, 2004; DURHAM; REGNIER, 2006).

As lectinas são encontradas em uma ampla variedade de espécies de plantas e animais, entretanto, estas substâncias estão presentes em maiores quantidades em grãos de leguminosas e gramíneas. A maioria das lectinas reconhece e se liga a açúcares simples tais como glicose, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina ou fucose (SILVA; SILVA, 2000). As lectinas representam uma classe de glicoproteínas de origem não imune que se ligam especificamente aos carboidratos, com capacidade de aglutinar células ou precipitar conjugados. Além de serem específicas, elas se ligam de forma reversível às moléculas às quais possuem afinidade, fato este que possibilita a sua aplicação na área biológica e médica tais como: investigação da superfície de células, caracterização de eritrócitos, como agentes mitogênicos, caracterização de estádios de desenvolvimento de microorganismos e purificação de glicoproteínas. (LIS; SHARON, 1986; VARKI et al., 1999; GENNARI-CARDOSO, 2000; NIGAM; GHOSH; SARMA, 2003; JIANG et al., 2007; YU et al., 2007).

A Concanavalina A (ConA) é uma lectina extraída do feijão-de-porco ou “jack bean” (*Canavalia ensiformis*), leguminosa da família Phaseoleae. Esta lectina foi a primeira lectina de leguminosa a ser isolada, seqüenciada e analisada quanto à estrutura tridimensional por cristalografia (SUMNER; HOWELL, 1936; EDELMAN et al., 1972; CUNNINGHAM et al., 1975) sendo atualmente uma das mais aplicadas em diferentes áreas da biologia (NIGAM; GHOSH; SARMA, 2003; JIANG et al., 2007; YU et al., 2007).

A N-acetil-glicosamina é uma lectina ligante de quitina que tem sido isolada de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos. Estruturalmente possui um anel

que exibe forte interação hidrofóbica. Esta lectina tem sido bastante estudada devido a sua característica antifúngica, uma vez que a quitina é o componente-chave da parede celular dos fungos (HUANG; XIE; GONG, 2000; CAMPOS-OLIVAS et al., 2001; STOEVA et al., 2001).

A lectina extraída de sementes da jaca ou “jackfruit” (*Artocarpus integrifolia*), conhecida como jacalina vem sendo muito estudada na área biológica. Possui uma porção N-terminal específica para a galactose além de possuir sítios hidrofóbicos e hidrofílicos. Embora possua sítios com afinidade para manose, estes são 20 vezes mais fracos que aqueles com afinidade para a galactose. Esta mesma fruta possui outra lectina chamada de KM+ ou artocarpim, é ligante de manose e está presente em menor quantidade em comparação à jacalina (ROQUE-BARREIRA; CAMPOS-NETO, 1985; SASTRY et al., 1986; KABIR, 1998; WU et al., 2003; AROCKIA et al., 2005; TRINDADE et al., 2006).

1.5 - IMPORTÂNCIA DO APERFEIÇOAMENTO DE TÉCNICAS QUE AUXILIEM NO IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE

Pela estimativa da OMS, a NC é responsável por 50.000 óbitos/ano e também por um número indeterminado, mas certamente muito maior, de indivíduos que sobrevivem apresentando graves complicações ou seqüelas neurológicas. Além das conseqüências sociais e econômicas para cada indivíduo e sua família, destacam-se também as repercussões para o sistema de saúde e de previdência social (MACHADO et al., 1996; DIOP et al., 2003; GONZALEZ et al., 2003; SCHANTZ; TSANG, 2003; SINGHI; SINGHI, 2004; HAWK et al., 2005; RAJKOTIA et al., 2007).

A região do Triângulo Mineiro constitui uma área de preocupação dentro do complexo teníase-cisticercose, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que se trata de uma região endêmica para este complexo (FERREIRA et al., 1994; COSTA-CRUZ et al., 1995; SILVA-VERGARA et al., 1995; SILVA-VERGARA et al., 1998; ESTEVES; CARVALHO; SILVA-VERGARA, 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

Considerando a severidade dos sintomas, o pleomorfismo de achados clínicos de pacientes com NC, inclusive crianças, e a endemicidade desta doença na região de Uberlândia, novas metodologias para pesquisa de anticorpos circulantes devem ser incessantemente investigadas. Avanços nesta área permitirão melhor integração da clínica, do imunodiagnóstico e da neuroimagem, contribuindo assim com o diagnóstico e o tratamento desta grave doença.

Apesar dos extratos totais serem amplamente utilizados em estudos soroepidemiológicos em áreas endêmicas, estes apresentam baixos índices de especificidade em

amostras de soro. Deste modo a obtenção e a identificação de glicoproteínas de alta especificidade obtidas a partir do fracionamento do extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* constitui o principal objetivo da maioria dos estudos sorológicos no diagnóstico da NC (ITO, 2002; DORNY et al., 2003; PRABHAKARAN et al., 2004; BUENO et al., 2005).

Os procedimentos que utilizam TX-114 na purificação de antígenos são rápidos e não necessitam de equipamentos especializados ou vários ciclos de ultracentrifugação. Deste modo a extração por este método é considerada simples, econômica, altamente eficiente, além de apresentar menor toxicidade em relação às extrações que utilizam solventes orgânicos (BRICKER et al., 2001; MANZOORI, BAVILI-TABRIZI, 2002).

Glicoproteínas capazes de interagir com lectinas vêm sendo cada vez mais estudadas devido a capacidade de mediar interações entre parasitas e células do hospedeiro. Considerando as propriedades da jacalina de ligar-se especificamente a diversos glicoconjugados, esta lectina vem se destacando bastante na área do isolamento de glicoproteínas O-ligadas (SARTRY et al., 1986; ROQUE-BARREIRA; CAMPOS-NETO, 1985; DURHAM; REGNIER, 2006). Além disto, ainda não existem estudos analisando o potencial desta lectina no isolamento de frações do extrato salino de metacestódeos de *T. solium*.

Diante disto, o fracionamento de extratos antigênicos utilizando estas técnicas possui grande relevância na área diagnóstica e estudos baseados nestes procedimentos podem contribuir para a obtenção de frações imunodominantes com alto poder discriminatório de pacientes com NC entre a população geral. Certamente, avanços nesta área contribuirão para a obtenção de testes mais sensíveis e específicos, possibilitando assim maior eficácia nos estudos soropidemiológicos e no imunodiagnóstico da NC.

2- OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Caracterização e comparação de diferentes frações antigênicas da forma metacestódea de *Taenia solium*, obtidas por hidrofobicidade usando Triton X-114 e cromatografia de afinidade em colunas de lectinas, no diagnóstico sorológico da neurocisticercose humana.

2.1.1 – Objetivos Específicos:

- Fracionar o extrato salino total (S) e o líquido de vesícula (LV) por hidrofobicidade através do uso do Triton X-114;
- Fracionar o extrato S por cromatografia de afinidade em diferentes colunas: de Agarose®-Jacalina, Agarose®-N-acetil-glicosamina e Agarose®-Concanavalina A
- Analisar o perfil eletroforético das amostras antigênicas obtidas;
- Comparar o potencial antigênico dos extratos e das frações obtidas em amostras de soro humano pelo ELISA e *immunoblotting*, na detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *Taenia solium*, no diagnóstico da neurocisticercose humana.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – ASPECTOS ÉTICOS E LOCAL DE ESTUDO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Diagnóstico de Parasitoses (Bloco 4C sala 239) e de Imunologia (Bloco 4C térreo) do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU.

3.2 - PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DE SORO

As amostras biológicas foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), Uberlândia, MG. Amostras de sangue foram colhidas no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU por punção venosa e enviadas para o Laboratório de Cisticercose da UFU, onde as amostras de soro foram obtidas após centrifugação. Estas amostras foram divididas em alíquotas de 500µl em microtubos, conservadas, volume/volume, em glicerina PA (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) identificadas e conservadas a -20°C até o momento do uso.

As amostras de soro padrão positivo foram obtidas de dois pacientes com diagnóstico confirmado de NC por meio de história clínica, dados epidemiológicos do paciente, TC, LCR e soro positivos no ELISA para cisticercose.

As amostras de soro padrão negativo foram obtidas de três indivíduos aparentemente saudáveis, que em três exames parasitológicos de fezes pelo método de Hoffmann, Pons e Janer (HPJ) (HOFFMANN, PONS, JANER, 1934) foram negativos para *Taenia* sp e demais parasitos intestinais. Além disto esses indivíduos apresentaram ELISA negativo para cisticercose e ausência de história anterior de teníase-cisticercose.

3.2.1 - Amostras de soro de pacientes com NC

Foram obtidas 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de NC, com diagnóstico confirmado de NC por meio de história clínica, dados epidemiológicos do paciente, TC, LCR e soro positivos no ELISA para cisticercose, constituindo o Grupo 1:

- Todos apresentavam pelo menos uma manifestação clínica sugestiva de NC: epilepsia (55%), cefaléia (50%), tonturas (27,5%), demência (12,5%), desmaios (10%), hidrocefalia (2,5%) e ausência de sinais ou sintomas de cisticercose em outros órgãos.
- Todos os pacientes eram provenientes ou residiam em áreas endêmicas e pelo menos dois deles relataram contato com portadores de *T. solium*.
- Todos os pacientes apresentavam ELISA-IgG positivo no LCR para anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* utilizando o extrato salino total de metacestódeos de *T. solium*.
- Todos os pacientes possuíam evidências de metacestódeos em exames de neuroimagem, sendo classificados de acordo com a viabilidade dos metacestódeos: vesicular (8/40; 20%), vesicular/calcificada (15/40; 37,5%) e calcificada (17/40; 42,5%) de acordo com classificação proposta por Sotelo; Guerrero; Rubio (1985).
- Dezoito (45%) pacientes eram do sexo feminino e 22 (55%) eram do sexo masculino, sendo a média das idades de 37 anos (variando de 10 a 60 anos) e a mediana de 36 anos.

3.2.2 - Amostras de soro de pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos

Para verificar a reatividade cruzada em métodos sorológicos, como já demonstrado por alguns autores (LARRALDE et al., 1989; MONTENEGRO et al., 1994), foram obtidas 62 amostras de soro de pacientes com outras parasitoses [Ancilostomídeos (6), *Ascaris lumbricoides* Linneu, 1758) (6), *Enterobius vermicularis* (Linneu, 1758) (6), *Giardia lamblia* (Anton Van Leeuwenhoek, 1681) (4), *Strongyloides stercoralis* Bavay, 1876 (4), *Taenia* sp. Linnaeus, 1758 (10), *Hymenolepis nana* (Siebold, 1852) (4), hidatidose por *Echinococcus granulosus* (10) *Trichuris trichiura* (Linneu, 1771) (2), *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) (10)].

Os pacientes deste grupo eram provenientes de áreas endêmicas para cisticercose, embora não apresentassem história prévia de contato com portadores de *T. solium*, teníase ou cisticercose. Os dados referentes ao sexo e idade não foram acessíveis em 18 (29%) destes pacientes, que constituíram de 10 amostras de pacientes infectados por *E. granulosus* (amostras provenientes do Laboratório Central de Porto Alegre) e 8 amostras de pacientes infectados por *S. mansoni* (amostras provenientes do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia). Entre os pacientes do Grupo 2, em que foram acessíveis os dados quanto ao sexo e

idade, 25 (57%) pertenciam ao sexo feminino e 19 (43%) ao sexo masculino. A média das idades foi de 23 anos (variando de 7 a 70 anos) e a mediana foi de 18 anos.

3.2.3 - Amostras de soro controle de indivíduos saudáveis

Foram obtidas 30 amostras de soro de indivíduos assintomáticos, que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelo método de HPJ (HOFFMANN; PONS; JANER, 1934) foram negativos para parasitos intestinais, negaram história anterior de teníase-cisticercose e foram negativos em exames sorológicos para cisticercose. Vinte e dois (73%) pertenciam ao sexo feminino e 8 (27%) ao sexo masculino. Nesses indivíduos a média das idades foi de 24 anos (variando de 2 a 41 anos) e a mediana foi de 23 anos.

3.3 – METACESTÓDEOS DE *T. SOLIUM*

Os metacestódeos de *T. solium* encontravam-se disponíveis no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde foi desenvolvido este estudo. Os metacestódeos foram obtidos de músculos esqueléticos de suínos naturalmente infectados. Os músculos dos suínos infectados foram acondicionados em caixas de isopor sob 4°C e levados para o Laboratório e os metacestódeos retirados por dissecação, lavados em solução salina (NaCl 0,15 M) e armazenados a -70 °C.

3.4 – EXTRATOS ANTIGÊNICOS

3.4.1 – Líquido de vesícula

Encontrava-se disponível no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU, onde foi desenvolvido este estudo. O líquido de vesícula (LV) foi obtido por rompimento dos metacestódeos íntegros, antes do congelamento dos músculos dos suínos. O LV foi centrifugado a 4.800 x g por 15 minutos a 4°C e posteriormente distribuído em alíquotas para armazenagem a -70 °C até o uso (COSTA, 1986).

3.4.2 - Extrato salino total de metacestódeos de *T. solium*

Foram utilizados 50 metacestódeos de *T. solium* para o preparo deste extrato, de acordo com Costa (1986). Os metacestódeos foram ressuspensos em 5 mL de água destilada e em seguida a mistura foi submetida a homogeneizador de tecidos (Glas Col[®], USA), a 0 °C por cinco ciclos de 1 minuto cada, em banho de gelo, e posterior tratamento de ultra-som (Thornton, Impec Eletrônica São Paulo, Brasil) a 40 kHz por quatro ciclos de 30 segundos cada em banho

de gelo. Após isotonização com 5 mL de solução de NaCl (0,3 M), foram empregados mais três ciclos de ultra-som. Em seguida, a mistura foi submetida a 4°C por duas horas sob agitação lenta e posteriormente centrifugada a 12.400 x g (Du Pont Sorvall® Products Newton, Conectcut, USA) por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante obtido constituiu o extrato salino total. A dosagem protéica foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma Chemical Co, St. Louis - MO, USA). Posteriormente o antígeno foi dividido em duas alíquotas de 5 mL, sendo uma dividida em alíquotas de 250 µL em tubos de “Eppendorf”, e a outra utilizada no fracionamento através de Triton X-114, mas ambas foram identificadas e conservadas a –20 °C até o momento do uso.

3.4.3 – Fracionamento do extrato salino total (S) e do líquido de vesícula (LV) através de Triton X-114

As frações antigênicas com diferentes graus de hidrofobicidade foram obtidas através de fracionamento com Triton X-114 pelo método de Bordier (1981), com algumas adaptações. Este método de fracionamento consistiu em separar as amostras antigênicas em duas fases: detergente e aquosa. A Figura 1 esquematiza resumidamente as etapas desta purificação.

O processo de fracionamento partiu de uma massa protéica total de 5 mg do extrato S e do LV obtidos nos item 3.4.1 e 3.4.2, respectivamente, na qual foi adicionado 1% de Triton X-114. A solução foi homogeneizada e mantida a 0 °C por 10 minutos (1ª etapa). Para separação das proteínas um gradiente de 6% de sacarose, 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl e 0,06% de Triton X-114 foi adicionado, na proporção de 2:3, e incubado a 37 °C por 10 minutos (2ª etapa). A solução foi então centrifugada por 10 minutos a 3.000 x g a temperatura ambiente (Ta) (3ª etapa). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico e a fase rica em detergente, ou seja, a fase mais densa, foi armazenada no mesmo tubo (4ª etapa). Ao sobrenadante obtido na 4ª etapa foi acrescentado 1% de Triton X-114 a fresco, esta solução foi homogeneizada e mantida a 0 °C por 10 minutos (5ª etapa). A solução obtida na 5ª etapa foi transferida para o tubo reservado na 4ª etapa, e então mantida a 37 °C por 10 minutos, centrifugada a 3.000 x g à Ta por 10 minutos (6ª etapa).

O sedimento obtido na 6ª etapa constituiu a fração detergente. Esta solução foi precipitada em acetona P.A (Merck) 4 °C (1:2), incubada a 4 °C por 18 horas e centrifugada a 3.000 x g por 30 minutos a 4 °C. Ao sobrenadante da 6ª etapa foi adicionado Tris-TX-114 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl e 4% de Triton X-114) sem sacarose na proporção de 1:1.

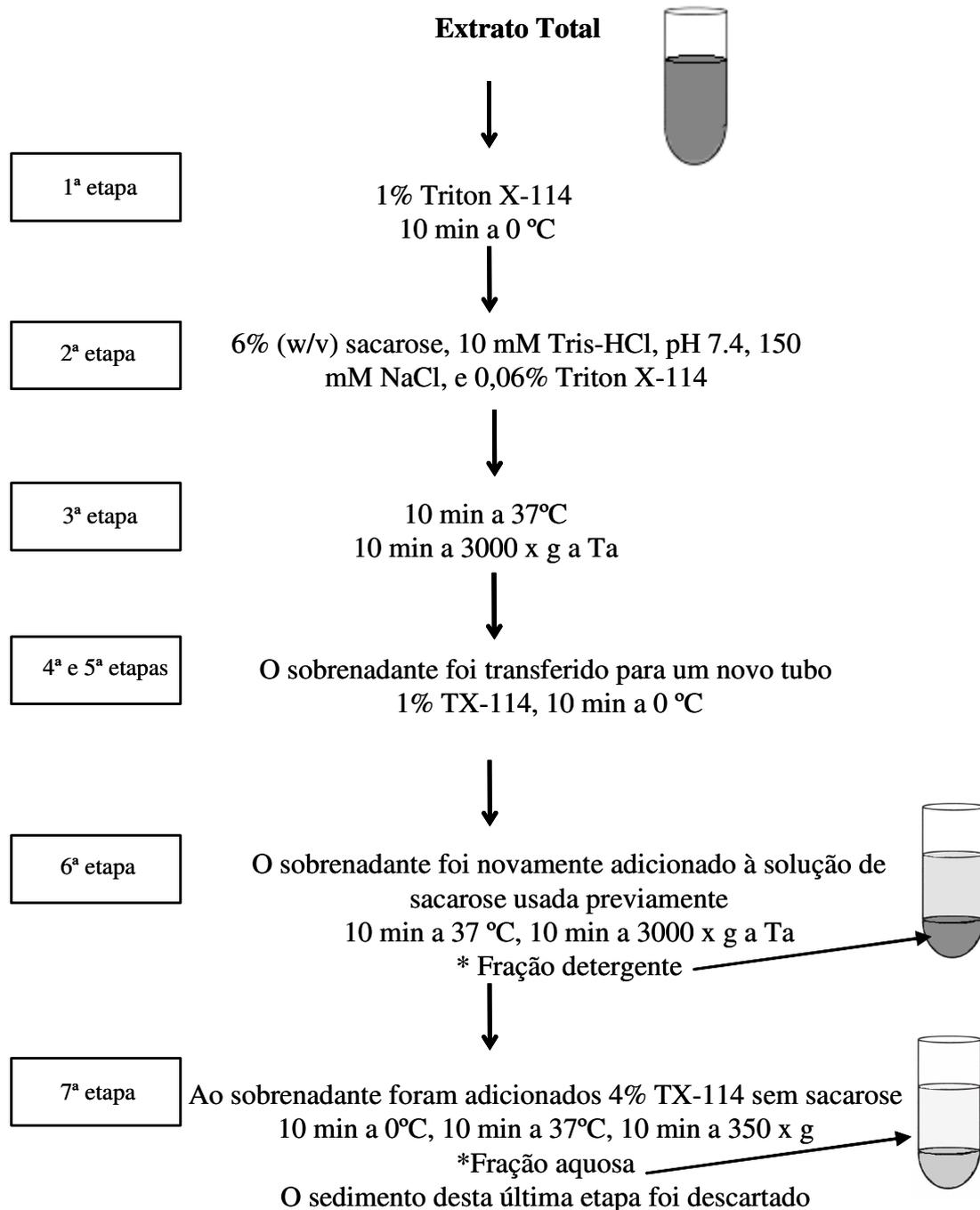


Figura 1. Esquema do processo de fracionamento através de Triton X-114. * As frações obtidas foram precipitadas em acetona (1:2) a 4°C/18 horas e centrifugadas 1580 x g/ 30 minutos a 4°C. Ta = temperatura ambiente.

Esta solução foi homogeneizada e mantida a 0 °C por 10 minutos, posteriormente a 37 °C por 10 minutos e centrifugada a 3.000 x g à Ta por 10 minutos (7ª etapa). O sobrenadante desta etapa constituiu a fração aquosa, sendo o sedimento descartado. A fração aquosa foi precipitada em acetona P.A (Merck) 4 °C (1:2), incubada a 4 °C por 18 horas e centrifugada a 3.000 x g por 30 minutos a 4 °C. A dosagem protéica foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma).

3.4.4 – Cromatografia de afinidade

3.4.4.1 - Cromatografia em Agarose®-Jacalina do extrato salino total (S)

A cromatografia de afinidade foi realizada de acordo com Hermanson, Mattson, Krohn (1995) com algumas modificações. A Figura 2 demonstra resumidamente o processo de cromatografia. Foram aplicados 3 mL do extrato S, contendo 12 mg de proteína total, em coluna com leito de 5mL de agarose®-Jacalina (Sigma) equilibrada com solução tamponada com fosfato (PBS 0,01M pH 7,2). A preparação permaneceu incubada por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Posteriormente a coluna foi lavada com PBS para obtenção da fração não ligante de jacalina (FNL-J). Frações de 2 mL do eluato-PBS foram coletadas e submetidas à leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 280nm, até uma leitura inferior a 0,02. O material adsorvido à coluna foi eluído com PBS acrescido de 0,4M de D-+-Galactose (Sigma) constituindo a fração ligante de jacalina (FL-J). Frações de 2 mL do eluato D-+-Galactose, foram coletadas e monitoradas pela leitura da DO até obtenção de um valor próximo de zero.

Após a obtenção dos eluatos a coluna foi lavada com um volume de 100 mL de PBS e o gel foi embebido em um volume de 10 mL de azida 0,02% em PBS. A coluna foi vedada com parafilme e armazenada a 4 °C.

As frações que apresentaram os maiores valores de DO foram reunidas em dois frascos distintos, sendo um para a FNL-J e outro para a FL-J. Estas amostras foram concentradas em aparelho Amicon (Stirred Ultrafiltration Cells, Millipore, USA), membrana YM-10 para um volume final de 5 mL. A FL-J foi dialisada no mesmo sistema utilizando tampão PBS em 10 vezes o seu volume inicial e posteriormente concentrada para um volume aproximado de 1,5 mL.

A dosagem protéica das amostras concentradas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma).

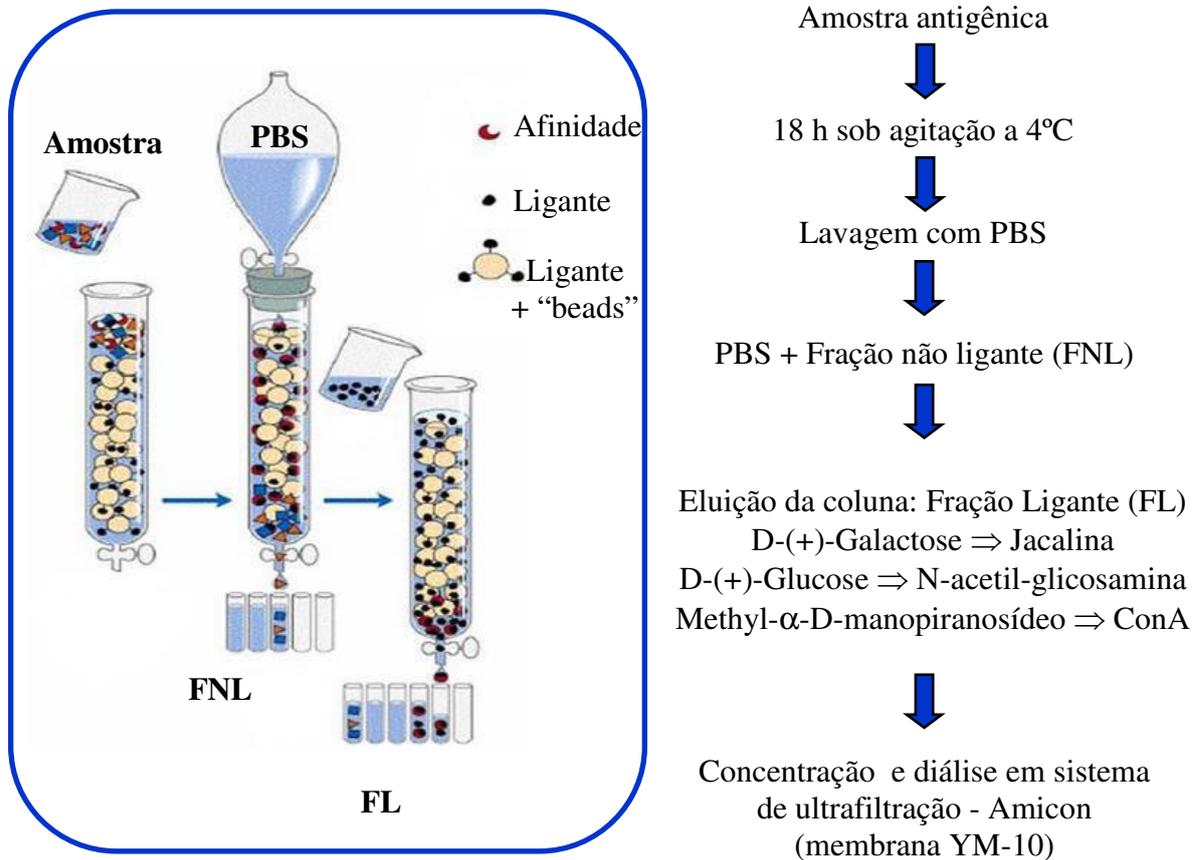


Figura 2. Esquema do processo de cromatografia de afinidade. PBS: solução salina tamponada com fosfato, FNL: fração não ligante, FL: fração ligante. ConA: Concanavalina A. (Adaptado de <http://bifi.unizar.es/research/electron-transfer/FMBvirtual/PurProt/Croma5.gif>)

3.4.4.2 - Cromatografia em Agarose®-N-acetil-glicosamina do extrato salino total (S)

A cromatografia de afinidade foi realizada de acordo com Hermanson, Mattson, Krohn (1995) com algumas modificações. Foram aplicados 3 mL do extrato S, contendo 12 mg de proteína total, em coluna com leito de 5mL de Agarose®-N-acetil-glicosamina (Sigma) equilibrada com PBS 0,01M (pH 7,2). A preparação permaneceu incubada por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Posteriormente a coluna foi lavada com PBS para obtenção da fração não ligante de N-acetil (FNL-N). Frações de 2 mL do eluato-PBS, foram coletadas e submetidas à leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 280nm, até uma leitura inferior a 0,02. O material adsorvido à coluna foi eluído com PBS acrescido de 0,4M de D-+-Glucose (Fluka, Biochemika) constituindo a fração ligante de N-acetil (FL-N). Frações de 2 mL do eluato D-+-Glucose anhydrous (Fluka, Biochemika) foram coletadas e monitoradas pela leitura da DO até obtenção de um valor próximo de zero.

Após a obtenção dos eluatos a coluna foi lavada com um volume de 100 mL de PBS e o gel foi embebido em um volume de 10 mL de azida 0,02% em PBS. A coluna foi vedada com parafilme e armazenada a 4 °C.

As frações que apresentaram os maiores valores de DO foram reunidas em dois frascos distintos, sendo um para a FNL-N e outro para a FL-N. Estas amostras foram concentradas em aparelho Amicon (Stirred Ultrafiltration Cells, Millipore, USA), membrana YM-10 para um volume final de 5 mL. A FL-N foi dialisada no mesmo sistema utilizando tampão PBS em 10 vezes o volume inicial e posteriormente concentrada para um volume final de aproximadamente 1,5 mL.

A dosagem protéica das amostras concentradas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma).

3.4.4.3 - Cromatografia em coluna de Concanavalina A (ConA) da Fração Não-ligante de Jacalina (FNL-J)

Para obtenção de frações ligantes e não ligantes de ConA a cromatografia de afinidade foi realizada de acordo com Hermanson, Mattson, Krohn (1995) com algumas modificações. A resina de ConA-Shepharose foi empacotada através de fluxo lento com 20 vezes o seu volume de PBS 0,01M (pH 7,2). Para evitar uma possível clivagem da ligação entre a ConA e a matriz Sepharose, foi realizada uma ligação cruzada com glutaraldeído de acordo com protocolo descrito por Scher, Resneck, Bloch (1989), com algumas modificações.

A resina foi lavada com 50 mL de Trietanolamina (Acros, Triethylamine 99%) pH 6,2. Esta solução constituiu de 2,7 mL de Trietanolamina em 100 mL de PBS, lembrando que o pH desta solução foi ajustado antes de completar o volume final de 100 mL com PBS. Aos 50 mL restantes de Trietanolamina pH 6,2 foi acrescentado Methyl- α -D-manopiranosídeo 0,2 M que em seguida foi utilizada para lavar a coluna. O fluxo foi interrompido deixando um volume de 5 mL da solução utilizada na etapa anterior acima do nível da resina. Esta solução foi necessária para homogeneizar 150 μ L de glutaraldeído (25%) na resina e possibilitar a agitação da mesma, que foi realizada em intervalos de 10 minutos por uma hora a temperatura ambiente. Após este intervalo a coluna foi lavada com 25 mL de glicina (glicina 1M + Tris Hcl 1M pH 9,2 + Methyl- α -D-manopiranosídeo) e posteriormente lavada com 25 mL de glicina 1M (Tris-Hcl 1M pH 9,2), sendo agitada a cada dois minutos com auxílio de uma pipeta Pasteur. A última etapa antes da adição a amostra constituiu da lavagem da coluna com 20 vezes o seu volume em PBS.

Foram aplicados 6 mL da FNL-J contendo 9 mg de proteína, em coluna com leito de 5mL de ConA. A preparação permaneceu incubada por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Posteriormente a coluna foi lavada com PBS 0,01M (pH 7,2) para obtenção da fração não ligante de ConA (FNL-ConA). Frações de 2 mL, foram coletadas e submetidas à leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 280nm, até uma leitura inferior a 0,02. O material adsorvido à coluna foi eluído com PBS 0,01M (pH 7,2) acrescido de de Methyl- α -D-manopiranosídeo 0,2 M (Fluka, Biochemika) para obtenção da fração ligante de ConA (FL-ConA). Frações de 2 mL foram coletadas e monitoradas pela leitura da DO até obtenção de um valor próximo de zero.

Após a obtenção dos eluatos a coluna foi lavada com um volume de 100 mL de PBS e o gel foi embebido em um volume de 10 mL de azida 0,02%. A coluna foi vedada com parafilme e armazenada a 4 °C.

As frações que apresentaram os maiores valores de DO foram reunidas em dois frascos distintos, sendo um para a FNL-ConA e outro para a FL-ConA. Estas amostras foram concentradas em aparelho Amicon (Stirred Ultrafiltration Cells, Millipore, USA), membrana YM-10 para um volume final de 5 mL. A FL-ConA foi dialisada no mesmo sistema utilizando tampão PBS em 10 vezes o volume inicial. Após a diálise o material foi concentrado para um volume aproximado de 1,5 mL.

A dosagem protéica das amostras concentradas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma).

3.5 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMOSTRAS ANTIGÊNICAS EM SDS-PAGE 12 %

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada para avaliar o perfil protéico dos extratos e das frações antigênicas obtidas. Os antígenos e os padrões de peso moleculares foram submetidos a SDS-PAGE 12%, sob condições não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

Os géis foram preparados entre placas de vidro (10 x 10 cm) com 1,0 mm de espessura em suporte próprio do sistema Mini Cuba de Eletroforese Vertical (Omniphor MV10 Comp). As amostras antigênicas foram preparadas em tampão de amostra 10X concentrado. Em pentes com molde para 10 poços as amostras foram utilizadas sob uma concentração final de 20 µg (coloração pela prata) e em pentes com molde para poço único as amostras foram utilizadas sob uma concentração final de 200 µg (transferência). As amostras somente foram aplicadas nos géis após serem submetidas a 98°C em banho-maria durante 3 minutos.

A migração das proteínas foi realizada em corrente de 20 mA e voltagem de 150 V (sistema vertical omniphor) por aproximadamente três horas. As proteínas em estudo foram visualizadas por coloração em nitrato de prata e comparadas aos padrões de peso moleculares (Sigma) das proteínas: β-galactosidase de *Escherichia coli* (116 kDa), fosforilase b de músculo de coelho (97 kDa), frutose-6-fosfato kinase de músculo de coelho (84 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo de galinha (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa) anidrase carbônica de eritrócitos de bovino (29 kDa) e α-lactalbumina bovina (14 kDa).

3.6 – COLORAÇÃO DO GEL POR NITRATO DE PRATA

A coloração do gel por nitrato de prata (AgNO₃) foi realizada de acordo com Friedman (1982), na qual os polipeptídeos se destacam em tons de amarelo-ferrugem. Após migração das proteínas o gel foi cuidadosamente mergulhado em solução fixadora [metanol a 50% (Merck), ácido acético a 12% (Merck), formaldeído a 0,05% (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) em água destilada] por uma hora, em seguida o gel submetido a três banhos em etanol (Merck) a 50%, de 10 minutos cada e um pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio penta-hidratado (Na₂S₂O₃, 5H₂O) a 0,02% (Merck) por um minuto. O gel foi lavado três vezes por 20 segundos cada em água destilada e impregnado com solução de

formaldeído a 0,04% adicionada de nitrato de prata (AgNO_3) a 2%, em câmara escura por 20 minutos. O gel foi lavado três vezes em água destilada por 20 segundos cada e revelado em solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3); 0,05% de formaldeído e 2% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,02% (Merck) até o aparecimento das bandas protéicas. A reação foi interrompida com solução de metanol a 50% e ácido acético puro a 10%. Para conservação e posterior manuseio, o gel foi estendido entre folhas de celofane embebidas em água destilada sobre uma placa de vidro e deixado em repouso para secar.

3.7- TESTES SOROLÓGICOS

3.7.1 - ELISA - Determinação da titulação do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase

Os extratos antigênicos foram analisados pelo ELISA na concentração de $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína total e as amostras de soro foram utilizadas na diluição de 1:200, determinada por titulação em bloco. Foram utilizadas amostras de soro padrão positivo e negativo para IgG anti-metacestódeo de *T. solium* diluídas em solução tamponada com fosfato pH 7,2 adicionada de Tween 20 a 0,05% (PBS-T) (Sigma), e controles contendo PBS-T frente aos antígenos e PBS-T na ausência de antígenos. O conjugado anti-IgG-humana marcado com peroxidase (fração Fc específica, Sigma), foi preparado em PBS-T nas seguintes diluições 1:500; 1:1000; 1:2000 e 1:4000 para obtenção do título ótimo.

3.7.2 - ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeo de *T. solium*

Os testes ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium*, em amostras de soro foram padronizados a partir do protocolo de COSTA (1986) com algumas modificações. A Figura 3 apresenta resumidamente as etapas do teste ELISA.

Placas de poliestireno (Interlab, São Paulo, Brasil) foram utilizadas como suporte para adsorção das amostras antigênicas. As placas foram sensibilizadas com $50\mu\text{L}$ de solução dos extratos antigênicos ($10\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6) a 4°C durante 18 horas, em câmara úmida. Após este período e três lavagens de 5 minutos PBS-T foram adicionados $50\mu\text{L}$ das amostras de soro a serem testadas (diluídas 1:200 em PBS-T). Em todas as placas foram incluídos controles de reação, constituindo de duas amostras de soro padrão positivo e três amostras de soro padrão negativo. Após incubação por 45 minutos a 37°C e três lavagens de cinco minutos com PBS-T foi adicionado $50\mu\text{L}$ do conjugado anti-IgG-

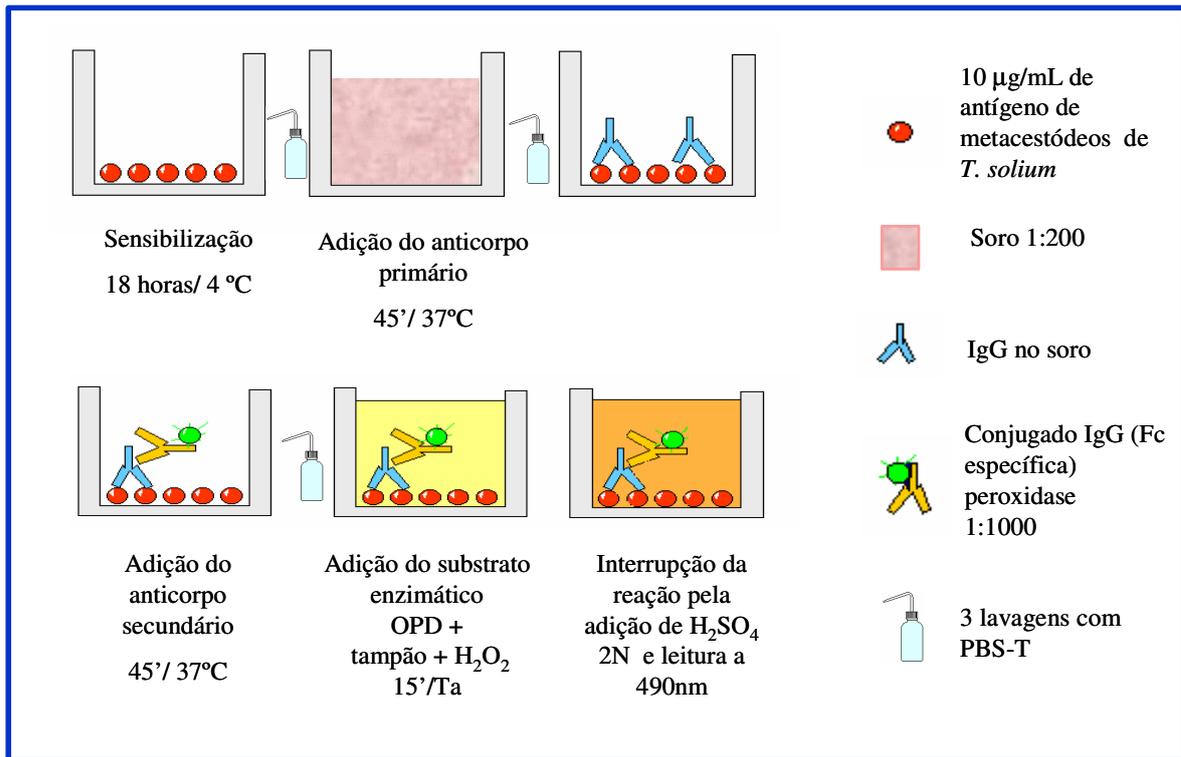


Figura 3. Esquema do ensaio imunoenzimático ELISA para determinação dos níveis de IgG específica frente às frações antigênicas de metacéstódeo de *T. solium*.

humana (fração Fc específica) marcado com peroxidase, diluído na concentração ideal em PBS-T. As placas foram novamente incubadas por 45 minutos à 37°C, em câmara úmida. Após três lavagens com PBS a reação foi revelada pela adição de 50 µL do substrato H₂O₂ e da solução cromógena de orto-fenilenodiamina (OPD) (Merck) preparado no momento do uso (5 mg de OPD + 12,5 mL de tampão citrato fosfato pH 5,0 + 5 µL de H₂O₂ 30%), (H₂O₂, Merck). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de solução de H₂SO₄ 2 N (Merck).

Os valores densidade óptica (DO) foram determinados a 492nm em leitor de ELISA (Termoplate) e o limiar de reatividade (*cut-off*) foi calculado pela média aritmética das densidades ópticas das três amostras de soro padrão negativo, acrescidas de dois desvios padrão (BASSI et al., 1991). O índice de reatividade (IR) foi calculado através da divisão do valor das DO das amostras pelo valor do *cut-off* para cada extrato antigênico obtido (PARDINI et al., 2002).

Os dados foram submetidos a análise por ‘two-graph receiver operating characteristic’ (TG-ROC), que avalia concomitantemente os valores de sensibilidade e de especificidade para obtenção com precisão do ponto ótimo (*cut-off*) da reação para cada extrato analisado (GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995). Foram calculadas as médias geométricas (mg) dos IR para cada grupo em cada extrato antigênico.

3.7.3 - Immunoblotting - Determinação da diluição das amostras de soro e da titulação ideal para detecção de IgG anti-metacésteos de *T. solium*

O conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-proxidase *whole molecule* (Sigma Chemical Co, USA) foi preparado em PBS-TM nas seguintes diluições 1:500; 1:1000; 1:1500 e 1:2000 para obtenção do título ótimo e cada amostra de soro padrão (2 positivas e 2 negativas) foi testada nas seguintes diluições 1:50; 1:100 e 1:200, sendo que cada diluição foi submetida a todas as quatro diluições do conjugado.

3.7.4 - Immunoblotting para detecção de IgG anti-metacésteos de *T. solium*

Após a migração eletroforética das proteínas submetidas a SDS-PAGE 12% foi realizada a transferência para membranas de nitrocelulose (poros de 0,45 µm) segundo técnica descrita por Towbin, Staehelin, Gordon (1979) com algumas modificações. A Figura 4 apresenta resumidamente as etapas deste processo. Foi preparado um “sandwich” com: seis

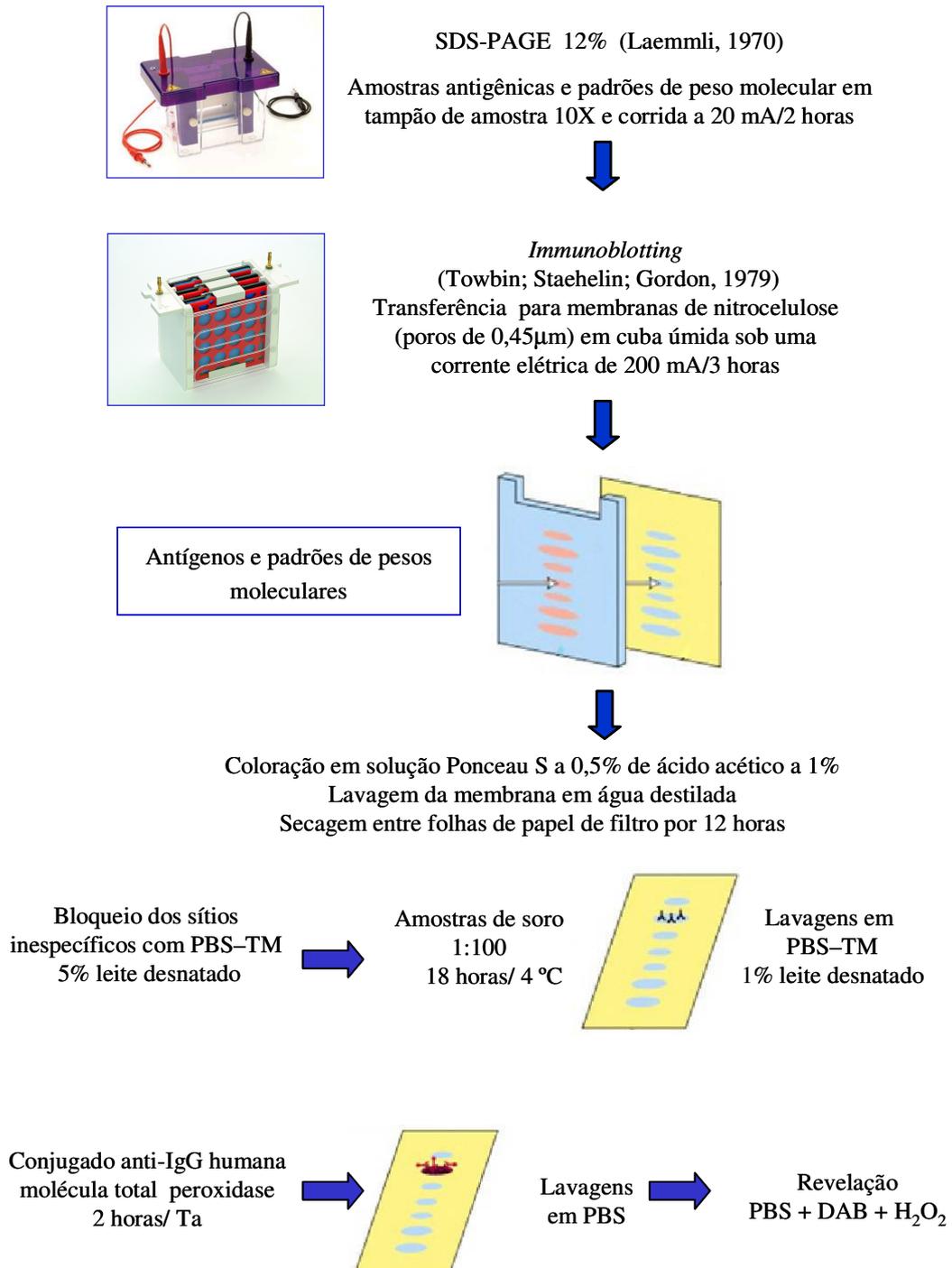


Figura 4. Esquema resumido das etapas da reação de *immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*. Ta = temperatura ambiente.

folhas de papel de filtro, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida contendo frações antigênicas e mais seis folhas de papel de filtro, todos umedecidos em tampão de transferência [TRIS 25mM, glicina 192mM e metanol a 20%] e colocados em uma cuba úmida de transferência (Tanque Sub Eletrobotters - omniphor) para aplicação de uma corrente elétrica de 200 mA por três horas. Durante todo o tempo de transferência a cuba ficou entre placas de gelo para que não houvesse aquecimento da solução de transferência.

Ao término da transferência o “sandwich” foi desmontado e a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S a 0,5% em ácido acético a 1%, para verificar a presença de bandas e conseqüentemente a eficiência da transferência. A membrana de nitrocelulose foi estendida entre papéis de filtro secos e acondicionada entre placas de vidros para uma perfeita secagem. Após 24 horas a membrana devidamente seca foi cortada em tiras verticais de 3mm, as quais foram identificadas e acomodadas em poços únicos das cubas (Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda) próprias para as reações de *immunoblotting*. Cada poço da cuba foi previamente preenchido com água destilada para evitar a presença de cargas eletrostáticas entre a membrana e a cuba. Posteriormente a água foi desprezada e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 1mL/poço de PBS-T acrescido de 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) (PBS-TM) por duas horas, à temperatura ambiente sob agitação horizontal lenta. Após o bloqueio a solução bloqueadora foi desprezada e as tiras foram lavadas com PBS-TM a 1%. As amostras de soro foram utilizadas na diluição de 1:100 em PBS-TM a 1% para um volume final de 500 µL/poço e as tiras então incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta.

Após as 18 horas as tiras foram submetidas a seis ciclos de lavagens durante cinco minutos cada, com PBS-T 1%, sendo posteriormente adicionados 500µL do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-proxidase (Sigma) na diluição ideal de 1:1500 em PBS-TM a 1%. Após duas horas sob agitação lenta a Ta as tiras foram submetidas a um ciclo de seis lavagens com PBS com intervalos de cinco minutos cada. A revelação da reatividade foi efetuada pela adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) em PBS mais H₂O₂ a 30%. Após a visualização das bandas antigênicas a reação foi interrompida por lavagens sucessivas com água destilada. As tiras foram, mantidas à Ta, estendidas entre folhas de papéis de filtro secas e então prensadas entre placas de vidro para uma secagem ideal. Posteriormente após estarem secas foram coladas em folhas de papel padronizado para as reações de *immunoblotting* e identificadas de acordo com a amostra de soro e o antígeno usado.

Posteriormente, cada tira foi individualmente analisada com base no reconhecimento das frações antigênicas pelos anticorpos presentes nas amostras de soro testadas.

3.8 – NORMAS DE BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento de colheita e manuseio do material biológico e dos reagentes e a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança de Chaves-Borges; Mineo (1997).

3.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico (ED) e o Índice de Youden (IY) foram determinados de acordo com Mineo et al., (2005).

Foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Eficiência do diagnóstico (\%)} = \text{Acurácia} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100$$

$$\text{IY} = (\text{sensibilidade}) + (\text{especificidade}) - 1 \quad \text{ou} \quad \text{IY} = \left[\frac{a}{a + c} + \frac{d}{b + d} \right] - 1$$

Onde:

a = verdadeiros positivos no teste

b = falso positivos no teste

c = falso negativos no teste

d = verdadeiros negativos no teste

a + c = pacientes com NC

b + d = pacientes do grupo 2 e indivíduos do grupo 3

A média geométrica dos valores do IR para cada extrato em cada grupo foi calculada utilizando o programa *GraphPad Prism Versão 4.0 - Windows software*.

A análise comparativa entre os extratos e entre os grupos no ELISA e entre as frequências de reconhecimento das banda antigênicas no *immunoblotting* foi realizada através do programa de BioEstatic versão 2.0. utilizando o teste de diferença entre duas proporções. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

A massa molecular das bandas antigênicas foi estimada a partir da curva de regressão linear construída pelos valores dos pesos moleculares dos marcadores x a motilidade relativa (Rf), obtida através da fórmula:

$$Rf = \text{Distância da origem à migração} / \text{Distância da origem ao ponto de referência.}$$

4 - RESULTADOS

4.1 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO SALINO TOTAL (S) E DO LÍQUIDO DE VESÍCULA (LV) ATRAVÉS DE TRITON X-114

A concentração protéica foi de 3 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1,3 mg/mL para o extrato S, fração DS e fração AS, respectivamente. A concentração protéica do LV foi de 5 mg/mL e de 1 mg/mL e 2,8 mg/mL para as frações DLV e ALV, respectivamente.

A análise da Figura 5 demonstra o perfil eletroforético do extrato S e do LV e de suas respectivas frações detergente (DS e DLV) e aquosa (AS e ALV) através do fracionamento com TX-114 em SDS-PAGE através de coloração pelo nitrato de prata.

A fração detergente revelou uma banda com massa molecular aparente entre 50 e 70 kDa para o extrato S e três bandas mais evidentes de 45, 48, e 80 kDa para o LV.

A fração aquosa apresentou quatro bandas protéicas com massas moleculares aparentes de 116, 110, 97 e 77 kDa para o extrato S e quatro bandas mais evidentes de 42, 48, 50-55 e 70-84 kDa para o LV.

4.2 – ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI-METACESTÓDEO DE *T. SOLIUM* UTILIZANDO O EXTRATO S E O LV E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES PURIFICADAS COM TX-114

As curvas de TG-ROC são demonstradas na Figura 6 para os extratos S e suas respectivas frações detergente (DS) e aquosa (AS) e na Figura 7 para o LV e suas respectivas frações detergente (DLV) e aquosa (ALV). A partir destas curvas foram definidos os pontos de corte para os testes ELISA, sendo definidas como positivas todas as amostras com IE > 1,05 para DLV; IE > 1,1 para os extratos S, DS, AS e ALV e IE > 1,3 para o LV.

Os níveis de IgG sérica anti-metacestódeo de *T. solium* determinados por ELISA e as porcentagens de positivities, utilizando o extrato S e o LV e suas respectivas frações (DS, DLV, AS e ALV) são demonstrados na Figura 8.

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam os resultados dos testes ELISA dos 40 pacientes com NC (Grupo 1), 62 pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (Grupo 2) e dos 30 indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3), respectivamente.

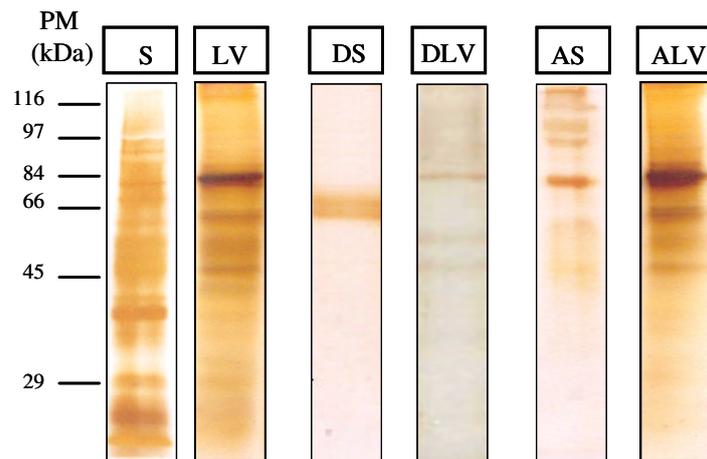


Figura 5. Perfil eletroforético dos extratos salino total (S) e líquido de vesícula (LV) de metacestódeos de *T. solium* e suas respectivas frações detergente (DS e DLV) e aquosa (AS e ALV) obtidas com TX-114. Padrões de peso molecular são demonstrados à esquerda em kDa.

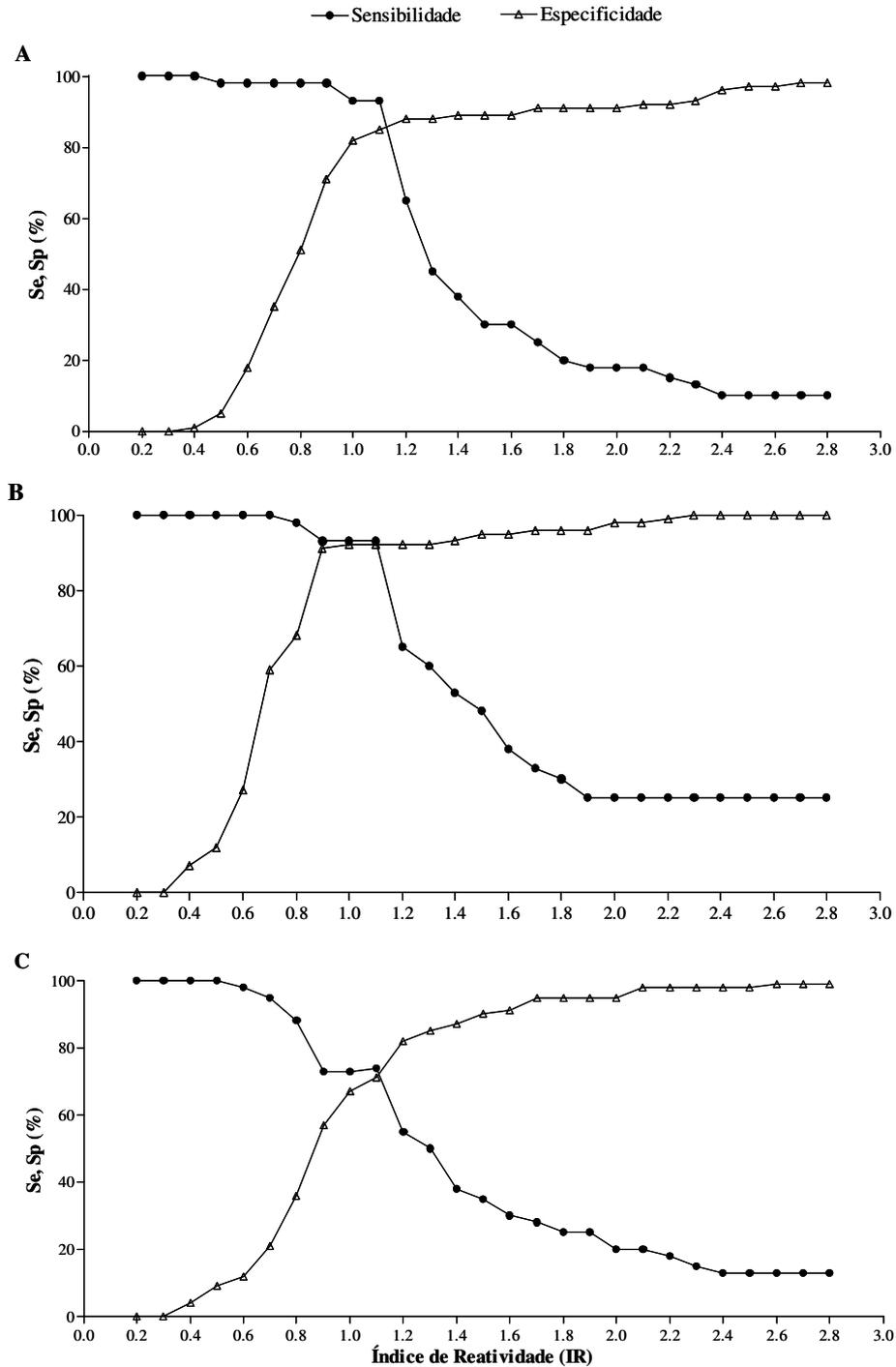


Figura 6. Análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* frente ao **extrato salino total** (A) de metacestódeos de *T. solium* e suas respectivas frações antigênicas, detergente (B) e aquosa (C), obtidas pelo fracionamento com TX-114 em amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos do grupo 1 (pacientes com NC, n=40) para o cálculo de sensibilidade (Se) e dos indivíduos do grupo 2 (pacientes infectados com *Taenia* sp. e outras parasitoses, n=62) e grupo 3 (indivíduos saudáveis, n=30) para o cálculo de especificidade (Sp).

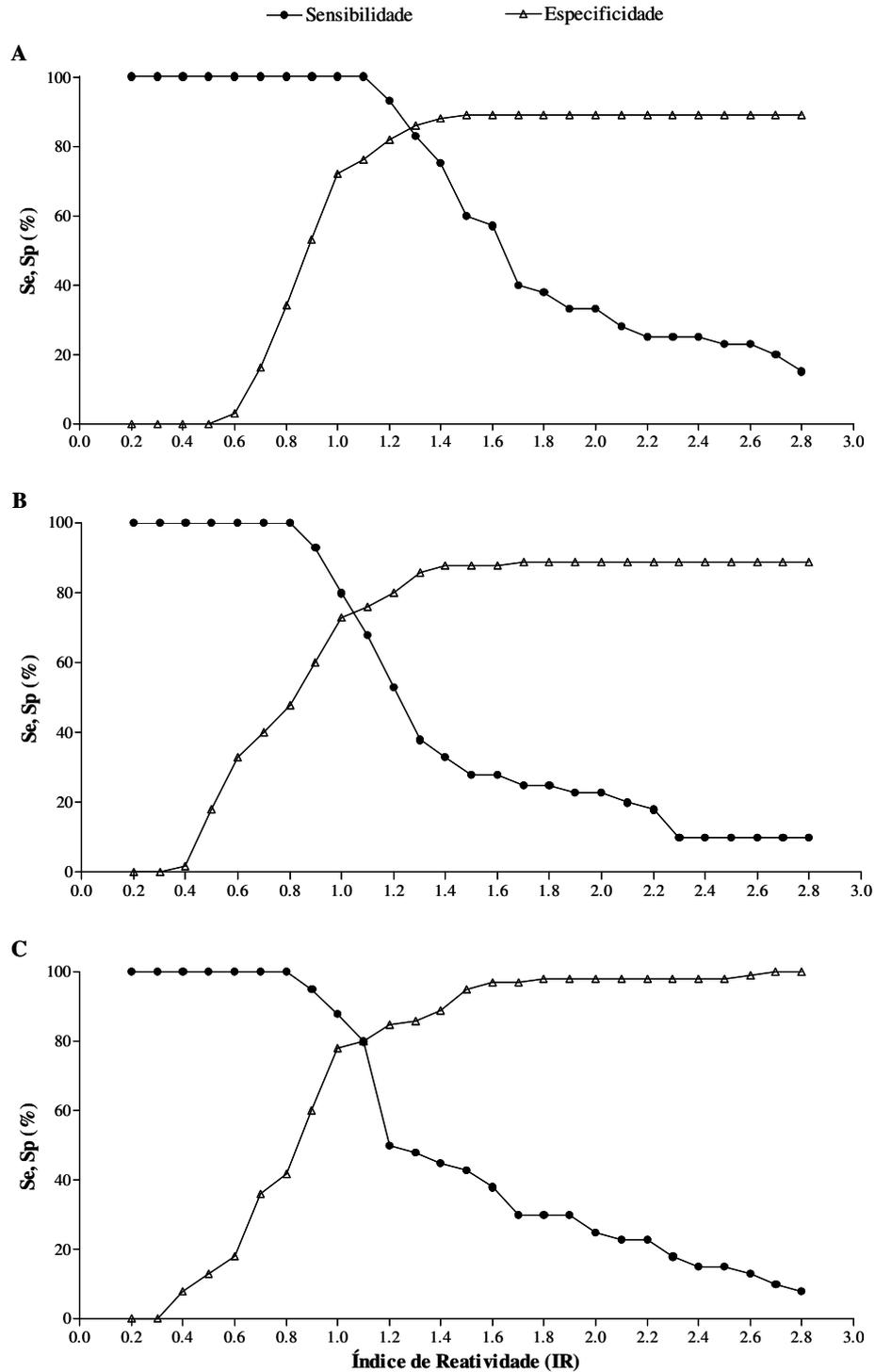


Figura 7. Análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* frente ao **líquido de vesícula** (A) de metacestódeos de *T. solium* e suas frações respectivas frações antigênicas, detergente (B) e aquosa (C), obtidas pelo fracionamento com TX-114 em amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos do grupo 1 (pacientes com NC, n=40) para o cálculo de sensibilidade (Se) e dos indivíduos do grupo 2 (pacientes infectados com *Taenia* sp. e outras parasitoses, n=62) e grupo 3 (indivíduos saudáveis, n=30) para o cálculo de especificidade (Sp).

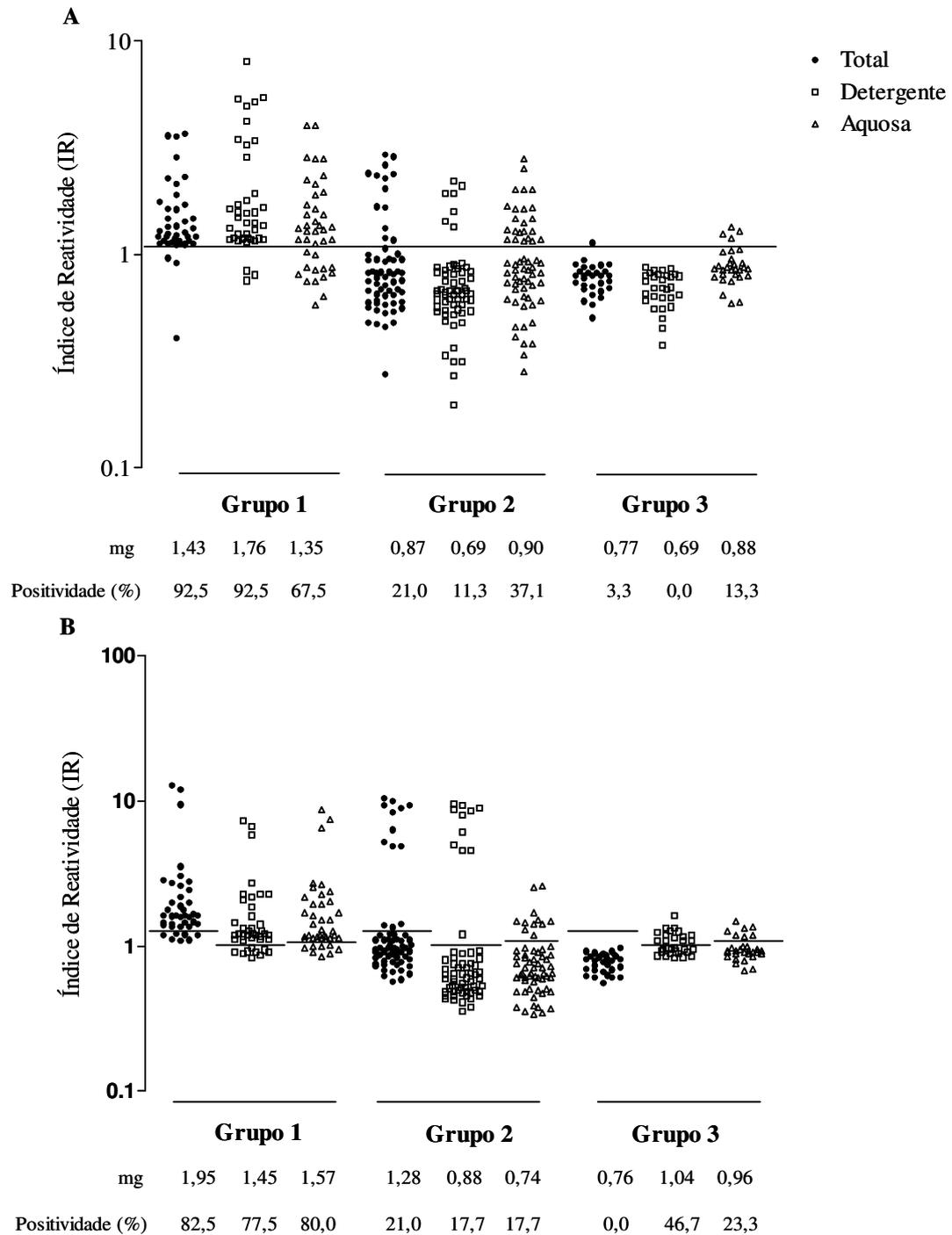


Figura 8. Níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* obtidos por ELISA frente ao **extrato salino total** (S) e o **líquido de vesícula** (LV) de metacestódeos de *T. solium* e suas frações respectivas frações antigênicas, detergente (DS e DLV) e aquosa (AS e ALV), obtidas pelo fracionamento com TX-114 em amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos dos grupos: 1-NC (n=40); 2-outras parasitoses (n=62) e 3-saudáveis (n=30) expressos em IR. A - extrato salino total e suas frações, B- líquido de vesícula e suas frações, a linha horizontal indica o ponto de corte da reação: IR=1,05 (DLV); IR=1,1 (S, DS, AS e ALV); IR=1,3 (LV), mg: média geométrica.

Tabela 1. Resultados dos testes ELISA dos 40 pacientes com neurocisticercose (Grupo 1), para detecção de anticorpos IgG anti-metacésteo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando como antígeno o extrato salino total (S) e o Líquido de Vesícula (LV) e suas respectivas frações: Detergente (DS e DLV) e Aquosa (AS e ALV).

Amostra	Sexo	Idade (anos)	ELISA					
			Total		Detergente		Aquosa	
			S	LV	DS	DLV	AS	ALV
1	F	28	+	+	+	+	+	+
2	F	37	+	+	+	+	+	+
3	F	14	+	+	+	+	+	+
4	M	51	+	+	+	+	+	+
5	M	53	+	+	+	+	-	-
6	M	41	+	+	+	+	+	+
7	M	36	-	+	-	+	-	-
8	M	30	-	+	-	+	-	+
9	F	19	+	+	+	+	+	+
10	M	29	+	+	+	+	+	+
11	F	41	+	+	+	+	+	+
12	M	61	+	+	+	+	+	+
13	M	18	-	-	-	+	-	+
14	M	35	+	+	+	+	+	+
15	F	44	+	+	+	+	+	+
16	M	26	+	+	+	+	+	+
17	M	29	+	+	+	-	+	+
18	F	57	+	+	+	+	-	+
19	F	33	+	-	+	+	-	-
20	M	60	+	+	+	+	+	-
21	M	60	+	-	+	-	-	+
22	M	46	+	+	+	+	+	+
23	M	10	+	+	+	+	+	+
24	M	10	+	+	+	-	-	-
25	F	50	+	-	+	-	-	-
26	F	46	+	+	+	+	+	+
27	F	16	+	+	+	+	-	+
28	F	41	+	+	+	-	-	+
29	F	49	+	+	+	+	+	+
30	F	28	+	-	+	-	+	-
31	M	43	+	+	+	+	+	+
32	M	38	+	+	+	+	+	+
33	M	32	+	+	+	+	+	+
34	M	27	+	+	+	+	+	+
35	F	35	+	-	+	-	+	+
36	F	53	+	+	+	+	-	+
37	F	28	+	-	+	-	+	-
38	M	30	+	+	+	-	+	+
39	M	44	+	+	+	+	-	+
40	F	43	+	+	+	+	+	+

F = Feminino; M = Masculino; - = Negativo; + = Positivo

Tabela 2. Resultados dos testes ELISA dos 62 pacientes com infecção por *Taenia* sp. e por outros parasitos (Grupo 2), para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando como antígeno o extrato salino total (S) e o Líquido de Vesícula (LV) e suas respectivas frações: Detergente (DS e DLV) e Aquosa (AS e ALV).

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Parasito	ELISA					
				Total		Detergente		Aquosa	
				S	LV	DS	DLV	AS	ALV
1	F	14	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
2	F	12	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
3	F	9	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
4	M	11	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	+
5	M	8	Ancilostomídeo	-	+	-	-	+	-
6	F	23	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
7	F	9	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	-	-	+	-
8	M	12	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
9	M	14	<i>A. lumbricoides</i>	+	-	-	-	+	-
10	F	8	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
11	M	14	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
12	M	8	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	+	-
13	F	10	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-
14	F	14	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-
15	M	10	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	+	-
16	M	7	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	+	-
17	F	23	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-
18	M	10	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-
19	M	9	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	+	-
20	M	7	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	-	-
21	M	10	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	-	-
22	F	10	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	-	-
23	M	61	<i>S. stercoralis</i>	-	-	-	-	-	-
24	F	54	<i>S. stercoralis</i>	+	-	-	-	+	-
25	M	39	<i>S. stercoralis</i>	-	-	-	-	+	-
26	M	39	<i>S. stercoralis</i>	-	-	-	-	-	-
27	F	23	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	+	-
28	F	25	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
29	F	70	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
30	F	30	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
31	F	40	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
32	F	30	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
33	F	30	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	+	-
34	F	8	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
35	F	29	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
36	F	45	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
37	M	40	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	+	-
38	F	41	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	+	-
39	M	45	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
40	F	22	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-

				S	LV	DS	DLV	AS	ALV
41	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+	+	-
42	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+	+	+
43	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+	+	+
44	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	-	+	+	+
45	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	-	+	+	+
46	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+	+	+
47	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+	+	+
48	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	-	+	+	+
49	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+	+	-
50	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+	+	+
51	F	31	<i>T. trichiura</i>	-	-	-	-	-	+
52	M	10	<i>T. trichiura</i>	-	-	-	-	-	+
53	F	24	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
54	M	29	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
55	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
56	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	+	-	-	-	-
57	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
58	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
59	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
60	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
61	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
62	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	+	-	-

F = Feminino; M = Masculino; - = Negativo; + = Positivo

ND = não disponível

Tabela 3. Resultados dos testes ELISA dos 30 indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3) para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando como antígeno o extrato salino total (S) e o Líquido de Vesícula (LV) e suas respectivas frações: Detergente (DS e DLV) e Aquosa (AS e ALV).

Amostra	Sexo	Idade (anos)	ELISA					
			Total		Detergente		Aquosa	
			S	LV	DS	DLV	AS	ALV
1	F	23	-	-	-	+	-	-
2	F	24	-	-	-	+	-	-
3	M	24	-	-	-	+	-	-
4	M	21	-	-	-	+	-	-
5	F	22	-	-	-	+	-	-
6	F	21	-	-	-	+	-	+
7	F	25	-	-	-	-	-	-
8	F	24	-	-	-	+	+	-
9	F	25	-	-	-	+	-	-
10	F	25	-	-	-	+	-	-
11	F	25	-	-	-	+	+	-
12	M	19	-	-	-	+	-	+
13	M	23	+	-	-	-	-	-
14	M	24	-	-	-	-	-	+
15	F	35	-	-	-	-	-	+
16	F	41	-	-	-	+	-	-
17	F	23	-	-	-	-	-	-
18	M	24	-	-	-	-	-	-
19	F	25	-	-	-	-	+	-
20	F	23	-	-	-	+	-	-
21	F	28	-	-	-	-	+	-
22	M	23	-	-	-	-	-	-
23	F	30	-	-	-	-	-	+
24	F	2	-	-	-	-	-	-
25	F	21	-	-	-	-	-	-
26	F	22	-	-	-	+	-	+
27	F	21	-	-	-	-	-	-
28	F	21	-	-	-	-	-	+
29	F	21	-	-	-	-	-	-
30	M	23	-	-	-	-	-	-

F = Feminino; M = Masculino; - = Negativo; + = Positivo

4.3 – IMMUNOBLOTTING PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI-METACESTÓDEO DE *T. SOLIUM* UTILIZANDO O EXTRATO S E O LV E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES

A Figura 9 demonstra o perfil de bandas imunogênicas reconhecidas por amostras de soro representativas no *immunoblotting*, utilizando o extrato S e o LV e suas respectivas frações (DS, DLV, AS e ALV). As porcentagens de reconhecimento das bandas imunogênicas no extrato S e em suas frações são demonstradas na Figura 10 e as porcentagens de reconhecimento das bandas imunogênicas no LV e em suas frações são apresentadas na Figura 11.

4.4 – COMPARAÇÃO DOS EXTRATOS ANTIGÊNICOS TOTAIS E FRACIONADOS

A curva da cromatografia de afinidade utilizando a coluna de jacalina e obtida a partir das leituras em absorvância para cada tubo (frações ligantes e não-ligantes) é demonstrada na Figura 12. A partir destes dados os oito primeiros tubos da fração não-ligante foram reunidos em uma única alíquota, uma vez que a partir do tubo de número nove os valores foram próximos a zero. Para a fração ligante foram reunidos os tubos de número 30 a 35, uma vez que estes apresentaram os maiores valores em densidade das amostras coletadas para esta fração.

A curva das leituras para a coluna de N-acetil está demonstrada na Figura 13. A fração não-ligante foi constituída pelas amostras contidas nos tubos de número um ao 14 e a fração ligantes pelas amostras dos tubos 34 ao 43.

A análise da Figura 14 demonstra a baixa afinidade da fração não-ligante de jacalina em cromatografia de afinidade em coluna de ConA. A fração não-ligante foi constituída a partir das amostras coletadas nos tubos de número um ao 6 e a fração ligante apenas pelas amostras dos tubos 31 ao 33.

O perfil eletroforético do extrato S e suas frações obtidas, tanto pela cromatografia de afinidade quanto pelo fracionamento pelo TX-114 é demonstrado na Figura 15. As bandas visualizadas na FNL-J foram de 24, 32, 45, 50-60, 68, 70 e 87 kDa e na FL-J foram de 14, 28, 35, 85 e 90 kDa. Após fracionamento da FNL-J com TX-114 as frações obtidas também demonstraram no SDS-PAGE um perfil distinto de bandas, sendo que bandas de 14, 40, 48, 50-60 kDa foram visualizadas na fração DFNL-J e bandas de 24, 45, 50, 66 e 85 kDa na fração AFNL-J. Quando esta mesma fração, ou seja, a FNL-J foi submetida a uma segunda etapa de fracionamento em coluna de ConA foram observadas bandas de massas moleculares de 32, 47, 52-60 e 87 kDa para a FNL-ConA e de 68, 87, 95, 110 e 116 kDa. As frações

obtidas a partir da cromatografia em N-acetil demonstraram as seguintes bandas: 20, 35, 38, 50, 62, 87, 90 e 97 kDa para a FNL-N e 40, 47 e 68 kDa para a FL-N.

A análise da Figura 16 demonstra os níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* obtidos por ELISA frente ao extrato S, frações obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Jacalina e em coluna de N-acetil-glicosamina utilizando amostras representativas de pacientes com NC, pacientes com hidatidose por *E. granulosus* e indivíduos saudáveis.

A Figura 17 demonstra os níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* obtidos no ELISA, frente às amostras provenientes do fracionamento da FNL-J pelo TX-114 e por cromatografia em coluna de ConA.

Os perfis de reconhecimento das bandas no *immunoblotting* foram distintos para cada amostra antigênica analisada. O perfil da FNL-J e da FL-J na detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* estão demonstrados na Figura 18. O perfil da FNL-ConA e da FL-ConA resultante da cromatografia da FNL-J em ConA está demonstrado na Figura 19. A Figura 20 também demonstra o *immunoblotting* utilizando amostras de soro representativas, mas utilizando como amostra antigênica às frações: DFNL-J e AFNL-J obtidas pelo fracionamento com TX-114. A partir dos resultados demonstrados nas Figuras 16-20 determinou-se que somente a FNL-J e suas respectivas frações detergente (DFNL-J) e aquosa (AFNL-J) obtidas pelo fracionamento com TX-114 seriam avaliadas frente a todas as 132 amostras de soro.

A análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* frente à FNL-J obtida em cromatografia do extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* e suas frações obtidas pelo fracionamento com TX-114 em amostras de soro dos Grupos 1, 2 e 3 é demonstrada na Figura 21. De acordo com os critérios da curva de TG-ROC ficou definido para a FNL-J, a fração DFNL-J e para a fração AFNL-J que todas as amostras com $IE > 1,1$ foram positivas.

A Figura 22 apresenta os níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* e as porcentagens de positividade obtidos por ELISA frente à FNL-J e suas respectivas frações antigênicas, detergente (DFNL-J) e aquosa (AFNL-J), obtidas pelo fracionamento com TX-114 em amostras de soro. As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os resultados dos testes ELISA utilizando a FNL-J e suas frações (DFNL-J e AFNL-J) obtidas pelo fracionamento com TX-114 frente às amostras de soro dos 40 pacientes com NC (Grupo 1), 62 pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (Grupo 2) e dos 30 indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3), respectivamente.

A reatividade cruzada foi mais freqüente em amostras de soro de pacientes com hidatidose por *E. granulosus* e infectados por *A. lumbricoides* no ELISA (Tabela 7). No *immunoblotting* apenas a fração DFNL-J demonstrou 100% de especificidade (Figura 23).

Os dados, referentes às sensibilidades, especificidades, eficiência do diagnóstico e o Índice de Youden, obtidos nos testes ELISA para as amostras antigênicas (S, DS, AS, LV, DLV, ALV, FNL-J, DFNL-J e AFNL-J) estão demonstrados na Tabela 8 e os valores de p para cada amostra antigênica em cada grupo estão apresentados na Tabela 9.

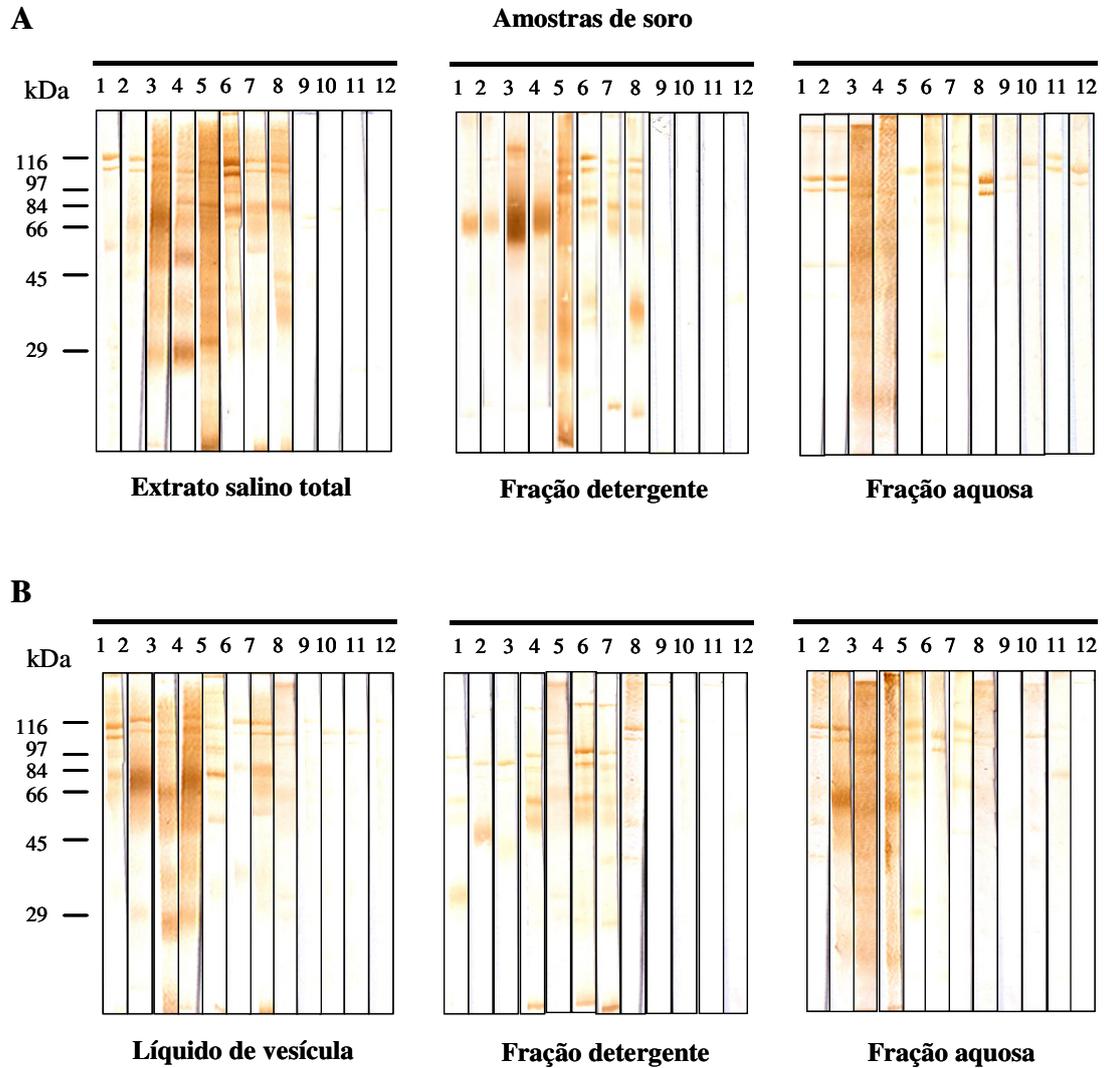


Figura 9. *Immunoblotting* do extrato salino total (A) e do líquido de vesícula (B) de metacestódeos de *T. solium* e suas respectivas frações antigênicas obtidas pelo fracionamento com TX-114. Amostras de soro representativas: 1-4 = pacientes com diagnóstico de NC; 5-8 = *E. granulosus*; 9-12 = indivíduos saudáveis.

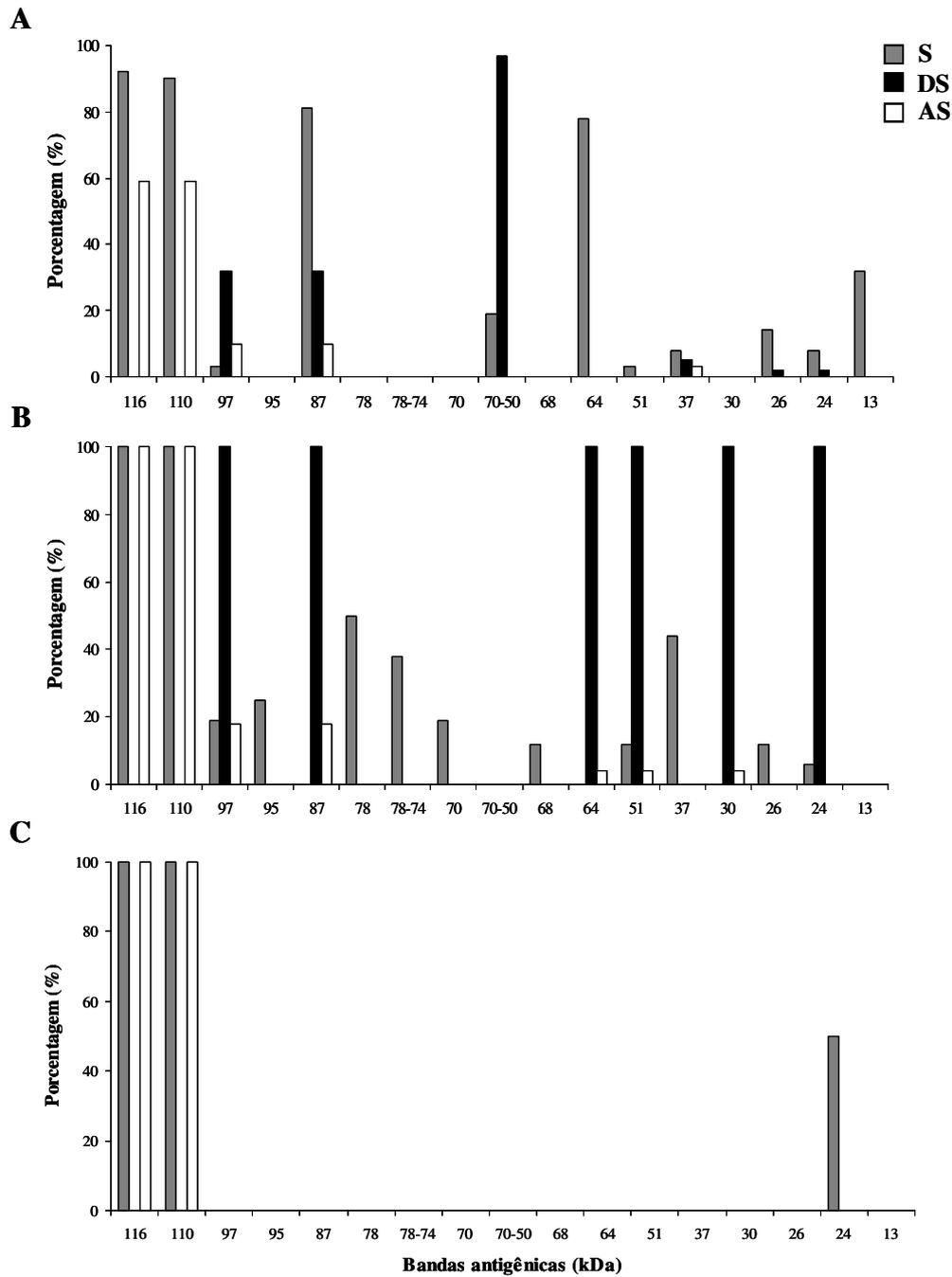


Figura 10. Porcentagem de reatividade das bandas imunogênicas reconhecidas pelas amostras de soro dos pacientes com Neurocisticercose (A), pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (B) e indivíduos aparentemente saudáveis (C) no *immunoblotting* utilizando o **extrato salino total** (S) e suas frações detergente (DS) e aquosa (AS) de metacestódeos de *T. solium*.

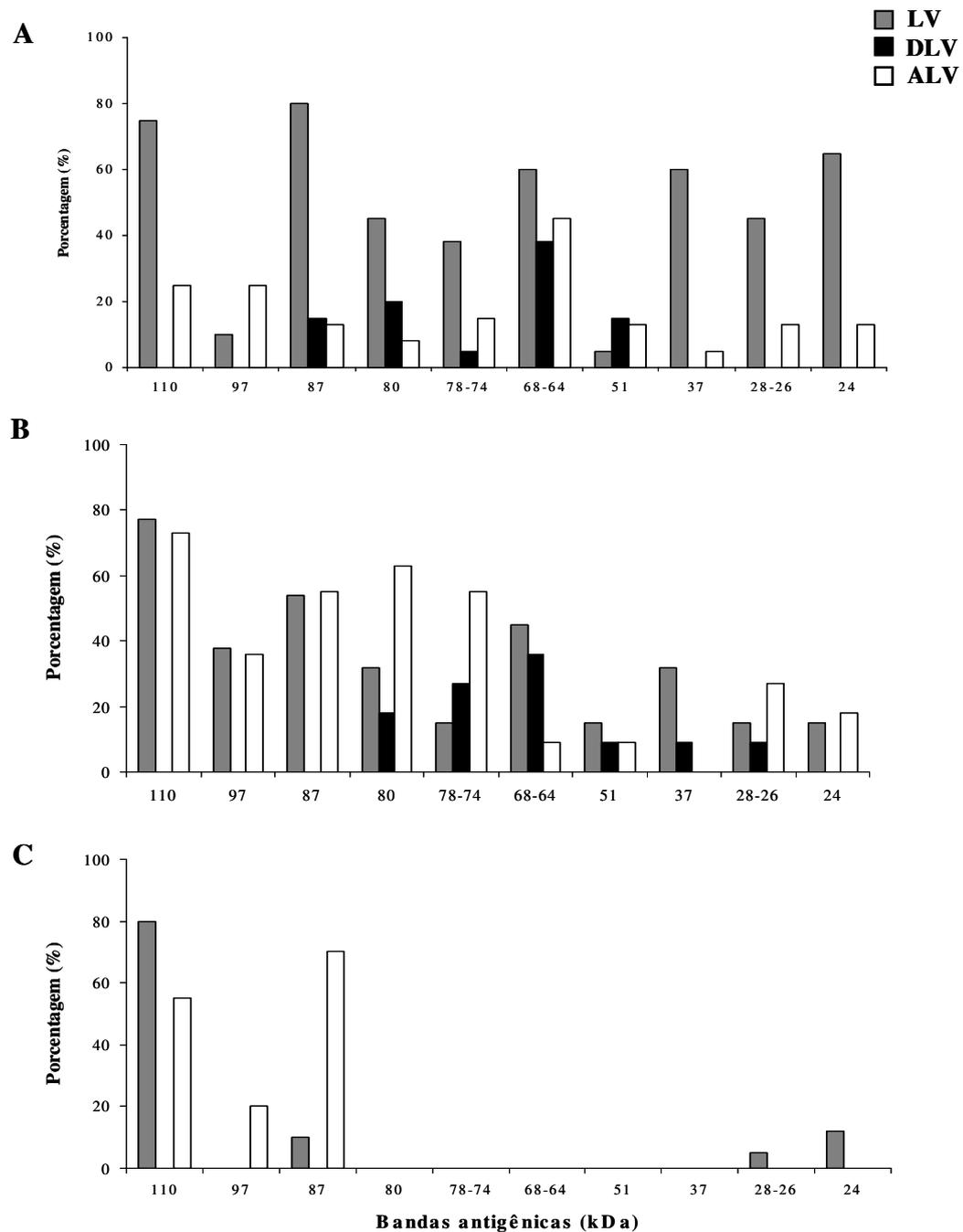


Figura 11. Porcentagem de reatividade das bandas imunogênicas reconhecidas pelas amostras de soro dos pacientes com Neurocisticercose (A), pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (B) e indivíduos aparentemente saudáveis (C) no *immunoblotting* utilizando o **líquido de vesícula** (LV) e suas frações detergente (DLV) e aquosa (ALV) de metacestódeos de *T. solium*.

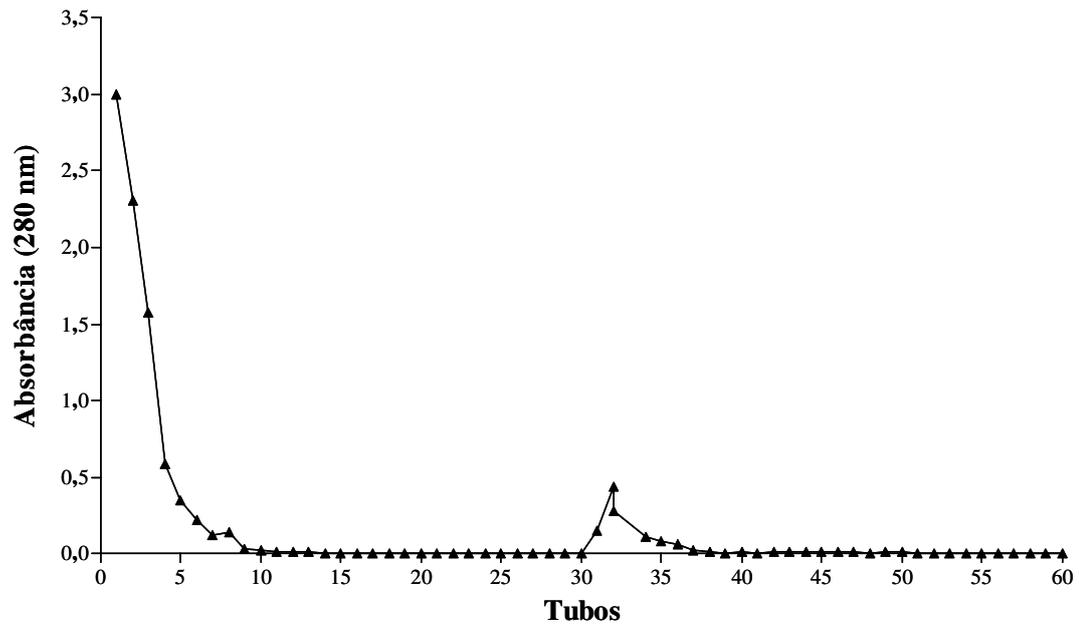


Figura 12. Cromatografia de afinidade em coluna de **Agarose®-Jacalina** utilizando o extrato salino total de formas metacestódeas de *T. solium*. As leituras das frações colhidas são dadas em absorvância por cada tubo isoladamente. Os tubos de 1 a 30 representam as frações não ligantes (FNL-J) eluídas com solução tamponada com fosfato (PBS) e os de 31 a 60 representam as frações ligantes (FL-J) eluídas com D-+-Galactose em PBS.

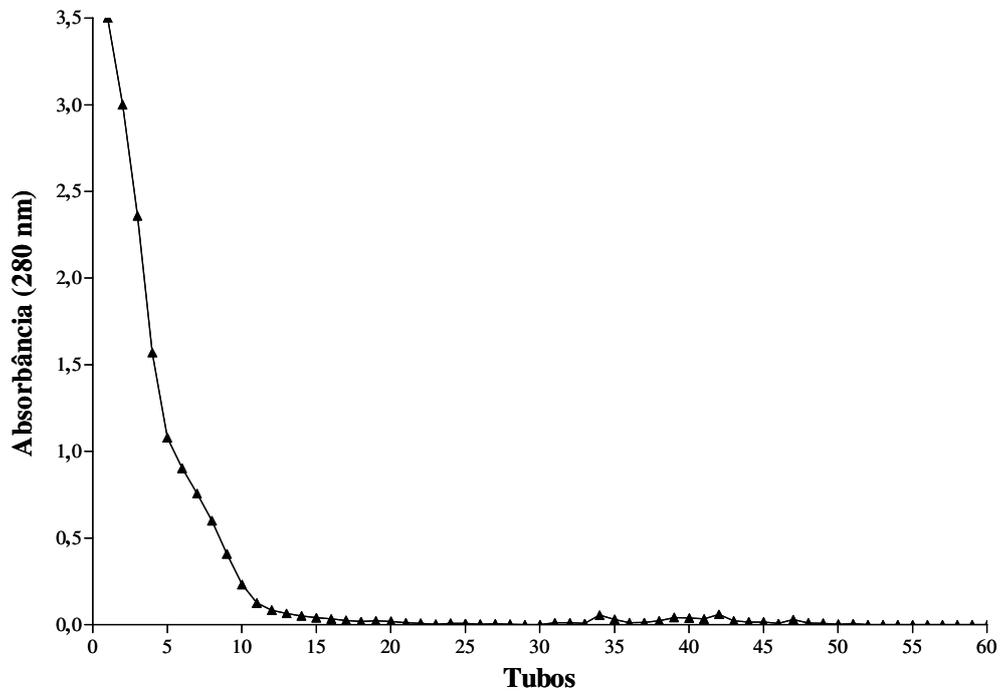


Figura 13. Cromatografia de afinidade em coluna **Agarose®-N-acetil-glicosamina** utilizando o extrato salino de formas metacestódeas de *T. solium*. As leituras das frações colhidas são dadas em absorvância por cada tubo isoladamente. Os tubos numerados de 1 a 30 representam as frações não ligantes (FNL-N) eluídas com solução tamponada com fosfato (PBS) e de 31 a 60 as frações ligantes (FL-N) eluídas com D-+-Glucose em PBS.

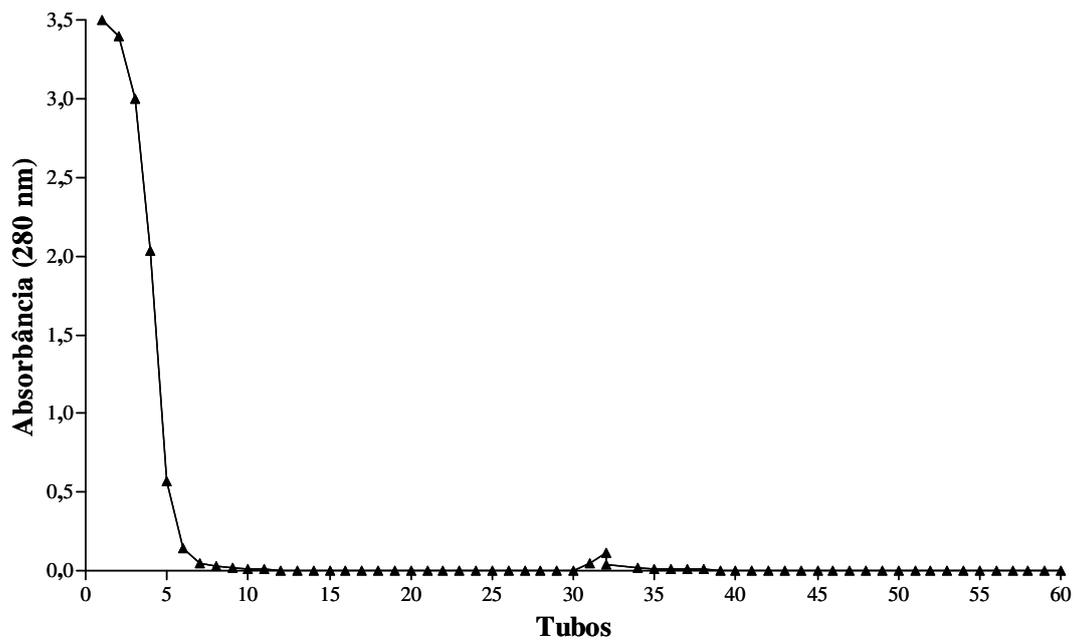


Figura 14. Cromatografia de afinidade em coluna de **Agarose-Concanavalina (ConA)** utilizando a fração não ligante (FNL-J) de jacalina do extrato salino total de formas metacestódeas de *T. solium*. As leituras das frações colhidas são dadas em absorvância por cada tubo isoladamente. Os tubos numerados de 1 a 30 representam as FNL de ConA (FNL-ConA) eluídas com solução tamponada com fosfato (PBS) e de 31 a 60 as frações ligantes eluídas com Methyl- α -D-Manopiranosídeo em PBS.

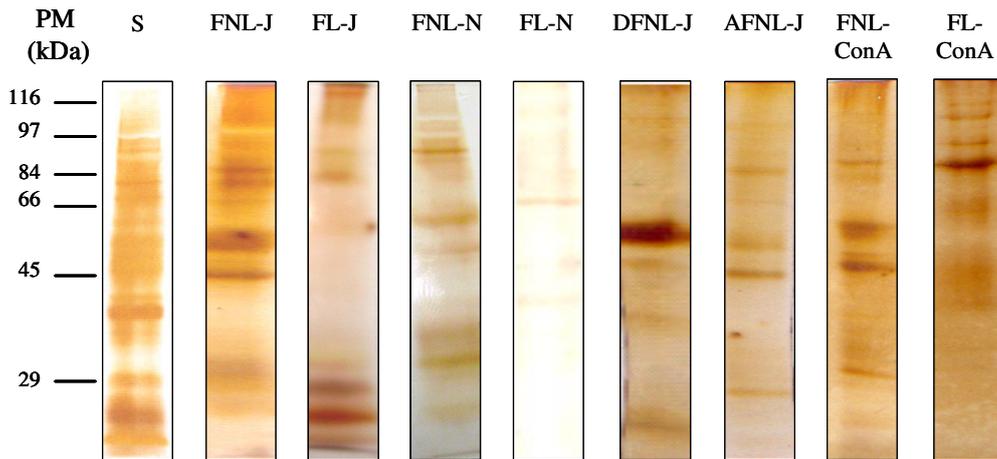


Figura 15. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% do extrato salino total (S) de metacestódeos de *T. solium* e suas respectivas frações purificados por cromatografia e TX-114. Extrato salino total (S), fração não-ligante do extrato S obtido em coluna de jacalina (FNL-J), fração ligante do extrato S obtido em coluna de jacalina (FL-J), fração não-ligante do extrato S obtido em coluna de N-acetil (FNL-N), fração ligante do extrato S obtido em coluna de N-acetil (FL-N), fração detergente da FNL-J (DFNL-J), fração aquosa da FNL-J (AFNL-J), fração não-ligante de ConA da FNL-J (FNL-ConA), fração ligante de ConA da FNL-J (FL-ConA).

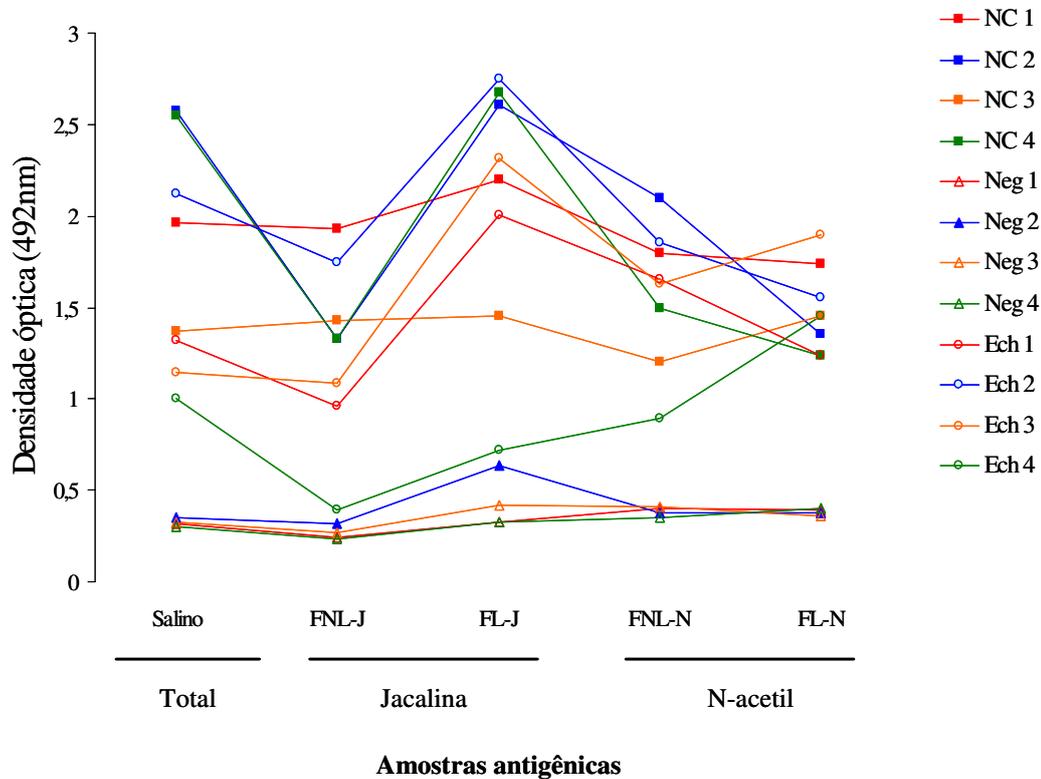


Figura 16. Níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* obtidos por ELISA frente aos diferentes extratos obtidos a partir do extrato salino total (S) de metacestódeos de *T. solium* fracionado por cromatografia de afinidade em coluna de Jacalina e N-acetil-glicosamina. Amostras de soro representativas na diluição de 1:200. NC = pacientes com neurocisticercose, Neg = indivíduos negativos, Ech = pacientes com hidatidose por *Echinococcus granulosus*, FNL-J = fração não ligante de jacalina, FL-J = fração ligante de jacalina, FNL-N = fração não ligante de N-acetil-glicosamina, FL-N = fração ligante de N-acetil.

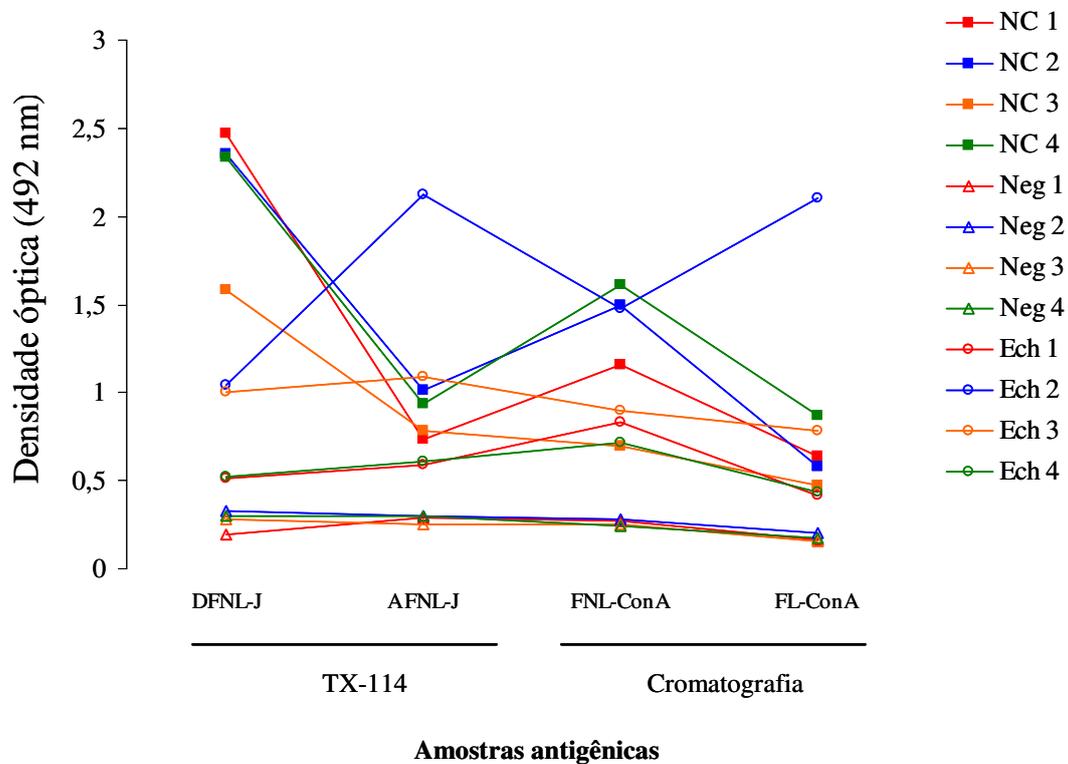


Figura 17. Níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* obtidos por ELISA frente às diferentes frações obtidas a partir da fração não-ligante da coluna de jacalina (FNL-J) do extrato salino (S) de metacestódeos de *T. solium*. Amostras de soro representativas na diluição de 1:200. NC = pacientes com neurocisticercose, Neg = indivíduos negativos, Ech = pacientes com hidatidose por *Echinococcus granulosus*. DFNL-J = fração detergente da FNL-J, AFNL-J = fração aquosa da FNL-J, FNL-ConA = fração não-ligante da coluna de Concanavalina A, FL-ConA = fração ligante da coluna de Concanavalina A.

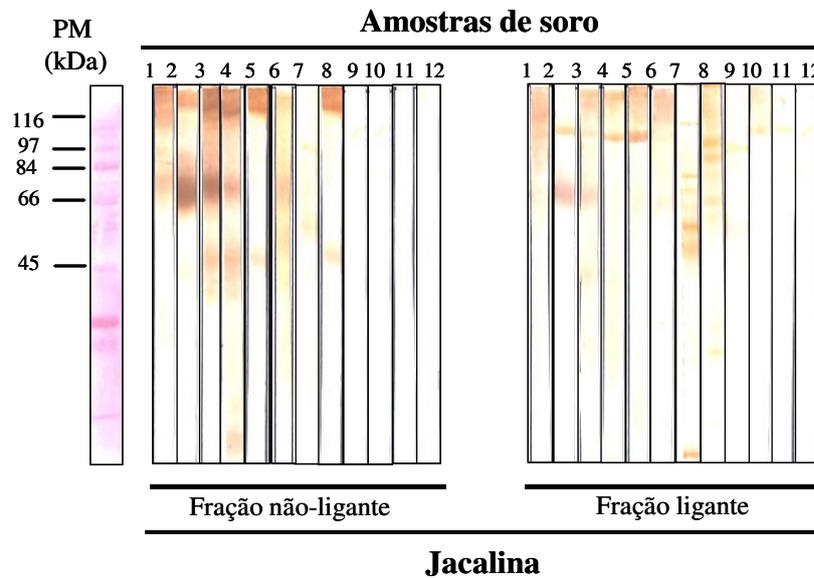


Figura 18. *Immunoblotting* utilizando amostras de soro representativas frente aos eluatos obtidos a partir da cromatografia de afinidade em **coluna de Jacalina** utilizando o extrato salino total de metacestódeos de *T. solium*. Linhas de 1 a 4: pacientes com diagnóstico de NC, Linhas de 5 a 8: pacientes com hidatidose por *E. granulosus*, Linhas de 9 a 12: indivíduos aparentemente saudáveis. A membrana de nitrocelulose corada pela solução de Ponceau contendo os padrões de peso moleculares é demonstrada à esquerda e os valores são dados em kDa.

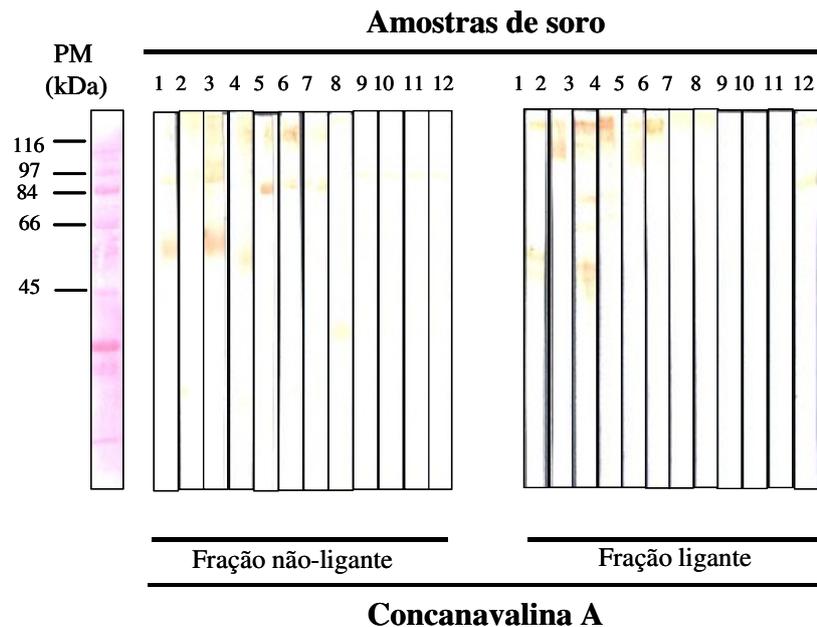


Figura 19. *Immunoblotting* utilizando amostras de soro representativas frente aos eluatos obtidos a partir da cromatografia de afinidade em coluna de concanavalina A utilizando a fração não ligante da cromatografia de afinidade em coluna de Jacalina do extrato salino total de metacestódeos de *T. solium*. Linhas de 1 a 4: pacientes com diagnóstico de NC, Linhas de 5 a 8: pacientes com hidatidose por *E. granulosus*, Linhas de 9 a 12: indivíduos aparentemente saudáveis. A membrana de nitrocelulose corada pela solução de Ponceau contendo os padrões de peso moleculares é demonstrada à esquerda e os valores são dados em kDa.

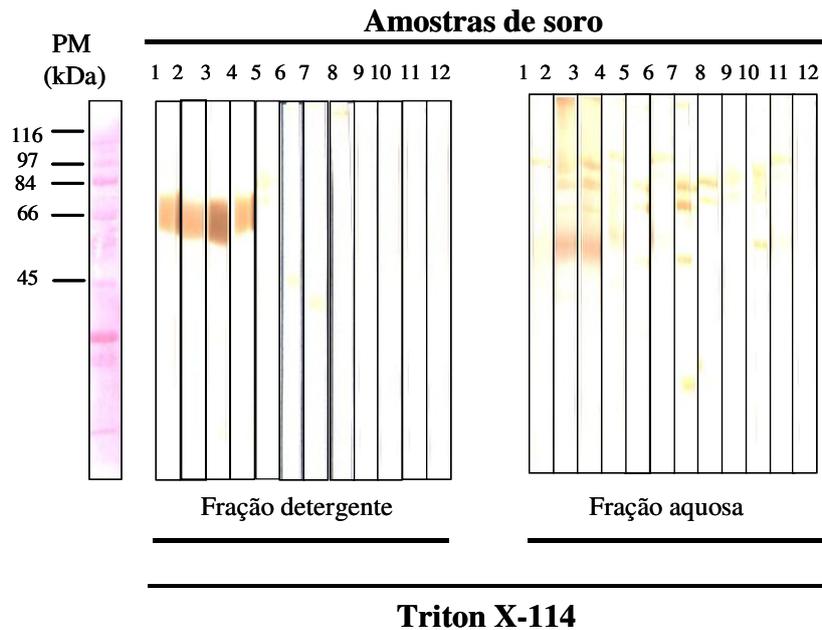


Figura 20. *Immunoblotting* utilizando amostras de soro representativas frente às frações antigênicas obtidas a partir da fração não ligante de jacalina (FNL-J) resultante da cromatografia em coluna de jacalina do extrato salino total de metacestódeos de *T. solium*. As frações detergente e aquosa constituem o resultado do fracionamento da FNL-J com TX-114. Linhas de 1 a 4: pacientes com diagnóstico de NC, Linhas de 5 a 8: pacientes com hidatidose por *E. granulosus*, Linhas de 9 a 12: indivíduos aparentemente saudáveis. A membrana de nitrocelulose corada pela solução de Ponceau contendo os padrões de peso moleculares é demonstrada à esquerda e os valores são dados em kDa.

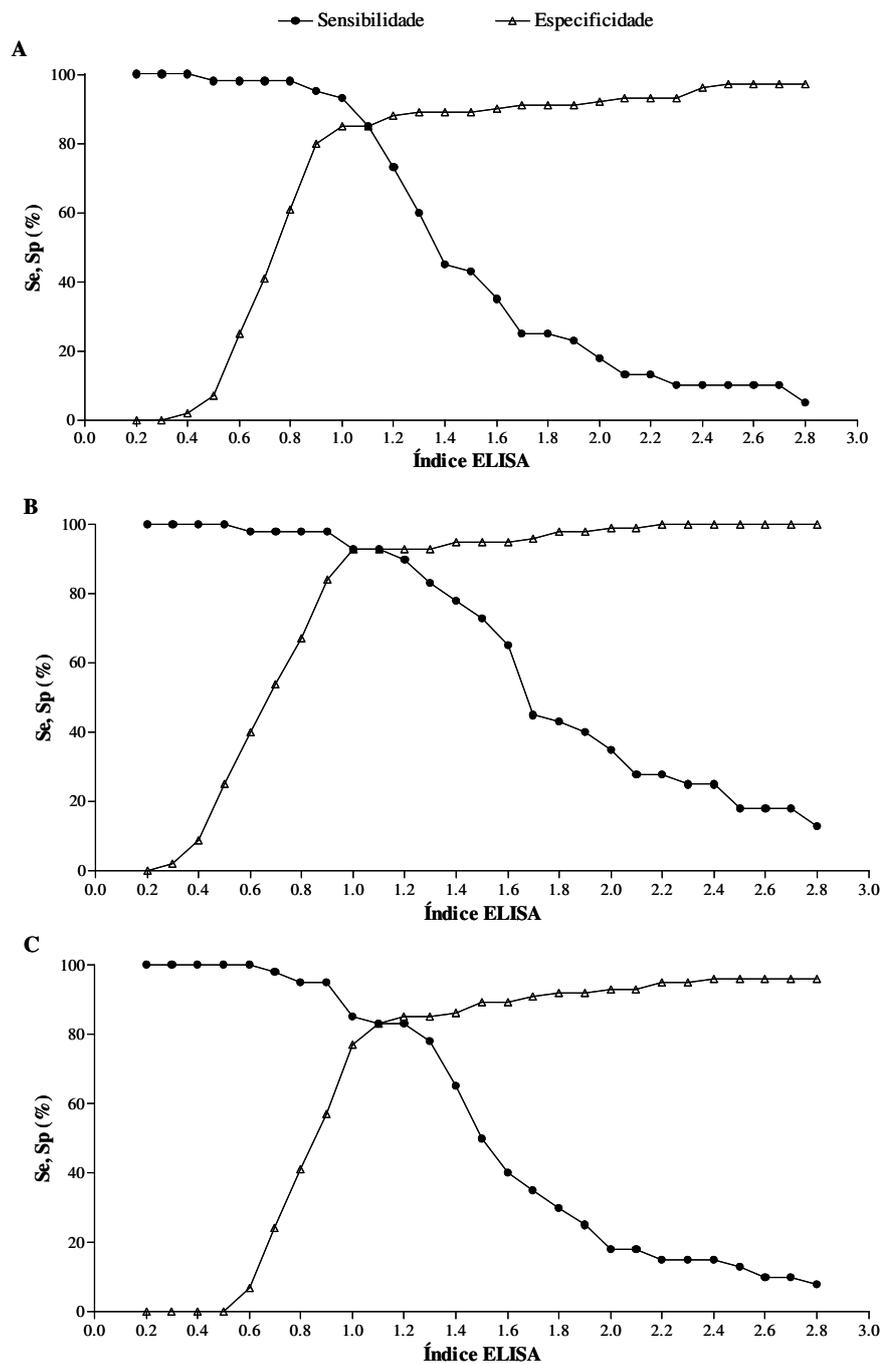


Figura 21. Análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* frente à fração não ligante de jacalina (FNL-J) obtida em cromatografia do extrato salino total (S) de metacestódeos de *T. solium* e suas frações detergente (DFNL-J) e aquosa (AFNL-J) obtidas pelo fracionamento com TX-114. Amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos do grupo 1 (pacientes com NC, n=40) para o cálculo de sensibilidade (Se) e dos indivíduos do grupo 2 (indivíduos com *Taenia solium* e outras parasitoses, n=62) e grupo 3 (indivíduos saudáveis, n=30) para o cálculo de especificidade (Sp). A = FNL-J; B = DFNL-J; C = AFNL-J.

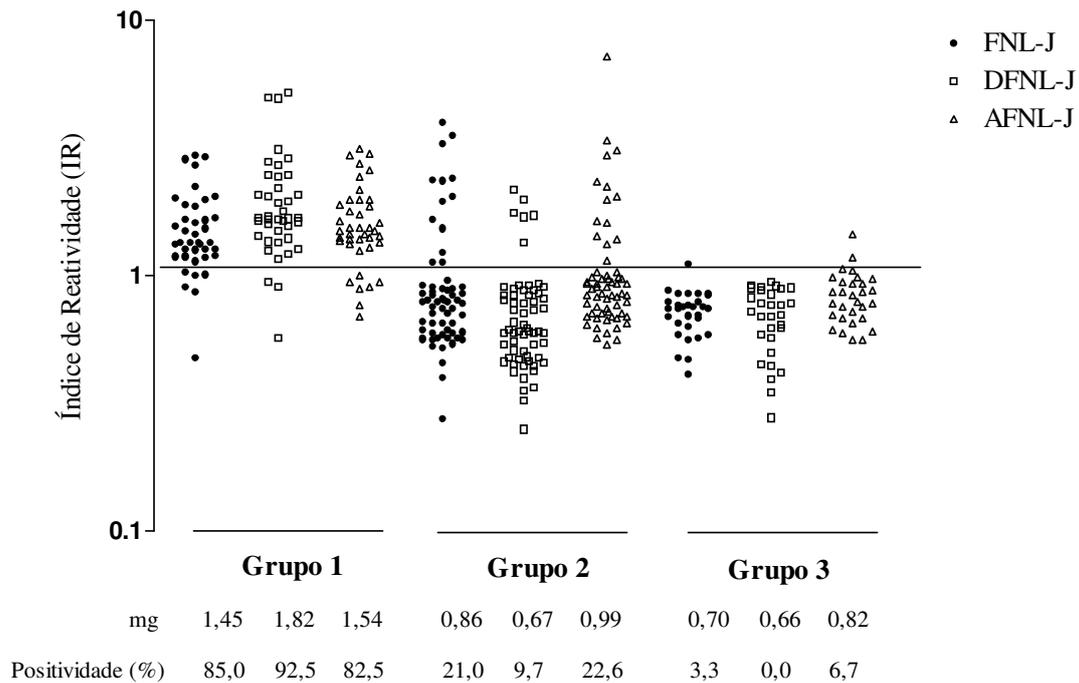


Figura 22. Níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* obtidos por ELISA frente à **fração não-ligante de jacalina** (FNL-J) do extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* e suas respectivas frações antigênicas, detergente (DFNL-J) e aquosa (AFNL-J), obtidas pelo fracionamento com TX-114. Amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos dos grupos: 1- neurocisticercose (n=40); 2- pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (n=62) e 3- indivíduos saudáveis (n=30) expressos em IR. A linha horizontal indica o IR=1,1; mg: média geométrica.

Tabela 4. Resultados dos testes ELISA dos 40 pacientes com neurocisticercose (Grupo 1), para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando como antígeno a fração não-ligante de jacalina (FNL-J) e suas frações detergente (DFNL-J) e aquosa (AFNL-J).

Amostra	Sexo	Idade (anos)	ELISA		
			FNL-J	DFNL-J	AFNL-J
1	F	28	+	+	+
2	F	37	-	+	+
3	F	14	+	+	+
4	M	51	+	+	+
5	M	53	-	+	+
6	M	41	+	+	+
7	M	36	-	-	-
8	M	30	-	-	-
9	F	19	+	+	+
10	M	29	+	+	+
11	F	41	-	+	+
12	M	61	+	+	+
13	M	18	-	-	-
14	M	35	+	+	+
15	F	44	+	+	+
16	M	26	+	+	+
17	M	29	+	+	+
18	F	57	+	+	+
19	F	33	+	+	+
20	M	60	+	+	+
21	M	60	+	+	+
22	M	46	+	+	+
23	M	10	+	+	+
24	M	10	+	+	-
25	F	50	+	+	-
26	F	46	+	+	+
27	F	16	+	+	+
28	F	41	+	+	+
29	F	49	+	+	+
30	F	28	+	+	+
31	M	43	+	+	+
32	M	38	+	+	+
33	M	32	+	+	+
34	M	27	+	+	+
35	F	35	+	+	-
36	F	53	+	+	+
37	F	28	+	+	+
38	M	30	+	+	+
39	M	44	+	+	-
40	F	43	+	+	+

F = Feminino; M = Masculino; - = Negativo; + = Positivo

Tabela 5. Resultados dos testes ELISA dos 62 pacientes com infecção por outros parasitos (Grupo 2), para detecção de anticorpos IgG anti-metacésteo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando como antígeno a fração não-ligante de jacalina (FNL-J) e suas frações detergente (DFNL-J) e aquosa (AFNL-J).

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Parasito	ELISA		
				FNL-J	DFNL-J	AFNL-J
1	F	14	Ancilostómídeo	-	-	-
2	F	12	Ancilostómídeo	-	-	-
3	F	9	Ancilostómídeo	-	-	-
4	M	11	Ancilostómídeo	-	-	-
5	M	8	Ancilostómídeo	-	-	-
6	F	23	Ancilostómídeo	-	-	-
7	F	9	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-
8	M	12	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-
9	M	14	<i>A. lumbricoides</i>	+	-	-
10	F	8	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-
11	M	14	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-
12	M	8	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-
13	F	10	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-
14	F	14	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-
15	M	10	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-
16	M	7	<i>E. vermicularis</i>	-	-	+
17	F	23	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-
18	M	10	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-
19	M	9	<i>G. lamblia</i>	-	-	+
20	M	7	<i>G. lamblia</i>	-	-	-
21	M	10	<i>G. lamblia</i>	-	-	-
22	F	10	<i>G. lamblia</i>	-	-	-
23	M	61	<i>S. stercoralis</i>	-	-	-
24	F	54	<i>S. stercoralis</i>	+	-	+
25	M	39	<i>S. stercoralis</i>	-	-	-
26	M	39	<i>S. stercoralis</i>	-	-	-
27	F	23	<i>Taenia</i> sp	-	-	-
28	F	25	<i>Taenia</i> sp	-	-	-
29	F	70	<i>Taenia</i> sp	-	-	-
30	F	30	<i>Taenia</i> sp	-	-	-
31	F	40	<i>Taenia</i> sp	-	-	-
32	F	30	<i>Taenia</i> sp	-	-	-
33	F	30	<i>Taenia</i> sp	-	-	-
34	F	8	<i>Taenia</i> sp	-	-	-
35	F	29	<i>Taenia</i> sp	+	-	-
36	F	45	<i>Taenia</i> sp	-	-	-
37	M	40	<i>H. nana</i>	-	-	+
38	F	41	<i>H. nana</i>	-	-	+
39	M	45	<i>H. nana</i>	-	-	-
40	F	22	<i>H. nana</i>	-	-	-

				FNL-J	DFNL-J	AFNL-J
41	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+
42	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+
43	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+
44	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	-	+
45	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	-	+
46	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+
47	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+
48	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	-	+
49	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+
50	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	-	-
51	F	31	<i>T. trichiura</i>	-	-	-
52	M	10	<i>T. trichiura</i>	-	-	-
53	F	24	<i>S. mansoni</i>	-	-	-
54	M	29	<i>S. mansoni</i>	-	-	-
55	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-
56	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-
57	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-
58	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-
59	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-
60	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-
61	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-
62	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	-	-	-

F = Feminino; M = Masculino; - = Negativo; + = Positivo; ND = não disponível

Tabela 6. Resultados dos testes ELISA dos 30 indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3) para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando fração não-ligante de jacalina (FNL-J) e suas respectivas frações: Detergente (DFNL-J), Aquosa (AFNL-J).

Amostra	Sexo	Idade (anos)	ELISA		
			FNL-J	DFNL-J	AFNL-J
1	F	23	-	-	-
2	F	24	-	-	+
3	M	24	-	-	-
4	M	21	-	-	-
5	F	22	-	-	-
6	F	21	-	-	-
7	F	25	-	-	-
8	F	24	-	-	-
9	F	25	-	-	-
10	F	25	-	-	-
11	F	25	-	-	+
12	M	19	-	-	-
13	M	23	+	-	-
14	M	24	-	-	-
15	F	35	-	-	-
16	F	41	-	-	-
17	F	23	-	-	-
18	M	24	-	-	-
19	F	25	-	-	-
20	F	23	-	-	-
21	F	28	-	-	-
22	M	23	-	-	-
23	F	30	-	-	-
24	F	2	-	-	-
25	F	21	-	-	-
26	F	22	-	-	-
27	F	21	-	-	-
28	F	21	-	-	-
29	F	21	-	-	-
30	M	23	-	-	-

F = Feminino; M = Masculino; - = Negativo; + = Positivo

Tabela 7. Reatividade das amostras de soro de pacientes do Grupo 2 (pacientes infectados com *Taenia* sp. e por outros parasitos) e do Grupo 3 (indivíduos aparentemente saudáveis) utilizando os extratos: salino total (S), líquido de vesícula (LV), fração não ligante de jacalina (FNL-J) e suas respectivas frações detergente (DS, DLV e DFNL-J) e aquosa (AS, ALV e AFNL-J) na detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* pelo teste ELISA.

	ELISA								
	n+ (%)								
	S	LV	FNL-J	DS	DLV	DFNL-J	AS	ALV	AFNL-J
Grupo 2 (n=62)									
Ancilostomídeo (n=6)	0	1 (16,7)	0	0	0	0	1 (16,7)	1 (16,7)	0
<i>A. lumbricoides</i> (n=6)	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	0	0	0	3 (50,0)	0	0
<i>E. vermicularis</i> (n=6)	0	0	0	0	0	0	2 (33,3)	0	1 (16,7)
<i>G. lamblia</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	1 (25,0)	0	1 (25,0)
<i>S. stercoralis</i> (n=4)	1 (25,0)	0	1 (25,0)	0	0	0	2 (50,0)	0	1 (25,0)
<i>Taenia</i> sp. (n=10)	0	0	1 (10,0)	0	0	0	2 (20,0)	0	0
<i>H. nana</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	2 (50,0)	0	2 (50,0)
<i>E. granulosus</i> (n=10)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	7 (70)	10 (100)	6 (60)	10 (100)	8 (80,0)	9 (90,0)
<i>T. trichiura</i> (n=2)	0	0	0	0	0	0	0	2 (100)	0
<i>S. mansoni</i> (n=10)	0	1 (10,0)	0	0	1 (10,0)	0	0	0	0
Grupo 3 (n=30)									
Indivíduos saudáveis	1 (3,3)	0	1 (3,3)	0	14 (46,7)	0	4 (13,3)	7 (23,3)	2 (6,7)
Total	14	13	14	7	25	6	27	18	16

n+ = número de amostras positivas

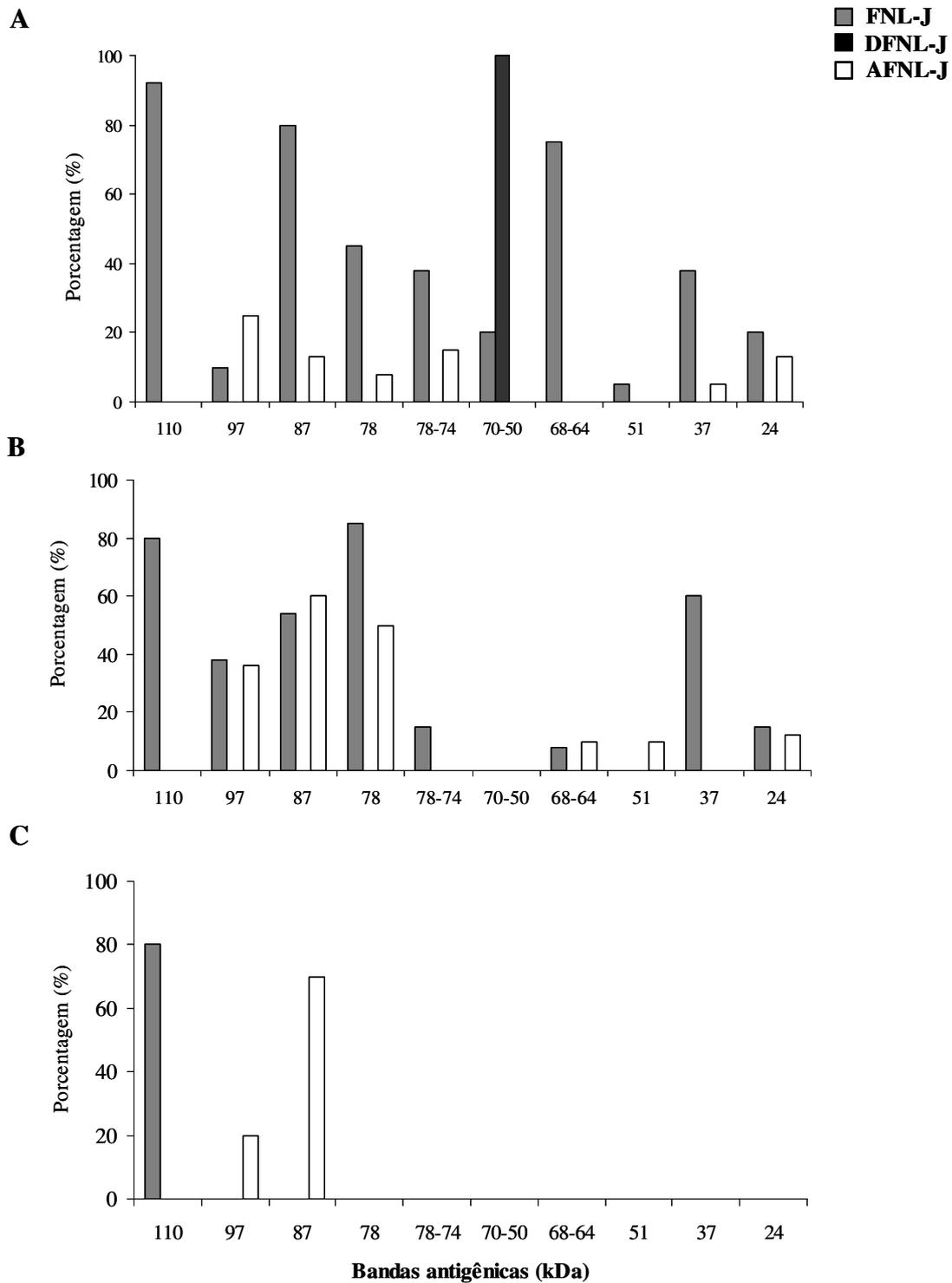


Figura 23. Porcentagem de reatividade das bandas imunogênicas reconhecidas pelas amostras de soro dos pacientes com Neurocisticercose (A), pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (B) e indivíduos aparentemente saudáveis (C) no *immunoblotting* utilizando a **fração não-ligante de jacalina** (FNL-J) e suas frações detergente (DFNL-J) e aquosa (AFNL-J) de metacestódeos de *T. solium* obtidas pelo fracionamento com TX-114.

Tabela 8. Sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico (ED) e Índice de Youden obtidos nos testes ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-metacésteo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando o extrato salino total (S) e suas frações (DS e AS), o líquido de vesícula e suas frações (DLV e ALV) e a fração não-ligante de jacalina (FNL-J) e suas respectivas frações (DFNL-J e AFNL-J) obtidas pelo fracionamento com TX-114.

Amostra antigênica	ELISA			
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	ED	Índice de Youden
S	92,5	84,8	87,1	0,77
LV	82,5	85,9	84,8	0,68
FNL-J	85,0	84,8	84,8	0,70
DS	92,5	92,4	92,4	0,85
DLV	77,5	72,8	74,2	0,50
DFNL-J	92,5	93,5	93,2	0,86
AS	67,5	70,6	69,7	0,38
ALV	80,0	80,4	80,3	0,60
AFNL-J	82,5	82,6	82,6	0,65

Tabela 9. Comparação dos diferentes extratos antigênicos para cada grupo estudado em relação aos valores de p obtidos a partir do número de sucessos em cada caso nos testes ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro dos Grupos: 1 = pacientes com NC, 2 = pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos e 3 = indivíduos saudáveis.

Extratos antigênicos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
LV e S	p = 0,0881	p = 1	p = 0,2768
LV e DLV	p = 0,2881	p = 0,3247	p = 0,0001
LV e ALV	p = 0,3873	p = 0,3247	p = 0,0113
DLV e ALV	p = 0,3923	p = 1	p = 0,0291
DLV e DS	p = 0,0301	p = 0,1539	p = 0,0001
ALV e AS	p = 0,1020	p = 0,0079	p = 0,1584
S e DS	p = 1	p = 0,0715	p = 0,2768
S e AS	p = 0,0026	p = 0,0239	p = 0,0806
DS e AS	p = 0,0026	p = 0,0004	p = 0,0806
S e FNL-J	p = 0,1442	p = 1	p = 1
S e DFNL-J	p = 1	p = 0,0405	p = 0,2768
S e AFNL-J	p = 0,0881	p = 0,4139	p = 0,2768
FNL-J e DS	p = 0,1442	p = 0,0715	p = 0,2768
FNL-J e DFNL-J	p = 0,1442	p = 0,0405	p = 0,2768
FNL-J e AS	p = 0,1442	p = 0,0239	p = 0,0806
FNL-J e AFNL-J	p = 0,3809	p = 0,4139	p = 0,2768
DS e DFNL-J	p = 1	p = 0,3847	p = 1
DS e AFNL-J	p = 0,0881	p = 0,0469	p = 1
DFNL-J e AS	p = 0,0026	p = 0,0002	p = 0,2768
DFNL-J e AFNL-J	p = 0,0881	p = 0,0254	p = 0,1503
AS e AFNL-J	p = 0,0607	p = 0,0387	p = 0,2768

Extratos antigênicos: extrato salino total (S) e suas frações (DS e AS), líquido de vesícula e suas frações (DLV e SLV), fração não-ligante de jacalina (FNL-J) e suas respectivas frações (DFNL-J e AFNL-J) obtidas pelo fracionamento com TX-114.

5 - DISCUSSÃO

A aplicabilidade de técnicas imunológicas utilizando antígenos de metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro ou LCR, representa papel fundamental no diagnóstico sorológico da NC, tanto no acompanhamento de pacientes durante o tratamento quanto em estudos soropidemiológicos da cisticercose (COSTA, 1986; WILSON et al., 1991; SIMAC et al., 1995; HUSAIN et al., 2008).

Embora extratos totais tenham sido amplamente utilizados em estudos soropidemiológicos em áreas endêmicas, a identificação e purificação de glicoproteínas de alta sensibilidade e especificidade obtidas a partir de metacestódeos de *T. solium* tem sido o principal objetivo na maioria dos estudos sorológicos no diagnóstico da NC (ITO, 2002; BUENO et al., 2005; MACHADO et al., 2007).

As altas sensibilidades e especificidades obtidas em testes imunológicos utilizando frações antigênicas purificadas são fatores preponderantes na busca por frações antigênicas que intensifiquem as reações verdadeiramente positivas assim como minimizem as reações cruzadas (NG; KO, 1994; ITO et al., 1999; KO; NG, 1998; SILVA; QUAGLIATO; ROSSI, 2000; PARDINI et al., 2002).

Os procedimentos de fracionamento que utilizam TX-114 são considerados simples, econômicos e altamente eficientes, uma vez que não necessitam de equipamentos especializados ou vários ciclos de ultracentrifugação. Além disso apresentam menor toxicidade em relação às extrações que utilizam solventes orgânicos. (BRICKER et al., 2001; MANZOORI, BAVILI-TABRIZI, 2002).

Neste estudo foi possível fracionar o extrato S e o LV de formas metacestódeas de *T. solium* pelo Triton X-114 obtendo frações antigênicas distintas, sendo possível a discriminação destas frações pelo SDS-PAGE. No presente estudo este método de purificação foi avaliado pela primeira vez no LV de formas metacestódeas de *T. solium* no diagnóstico da NC.

A análise das curvas de TG-ROC para os testes ELISA possibilitou a obtenção de um ponto ideal de corte para cada amostra antigênica estudada. Quanto ao extrato S, a única amostra antigênica em que a sensibilidade e especificidade se mantiveram constantes em três valores consecutivos foi a fração DS, demonstrando altos índices de sensibilidade e especificidade, próximos a 100%. Na análise do LV, nenhuma das amostras antigênicas apresentou o ponto de corte com valores de sensibilidade e especificidade acima de 90%. A

partir destes dados já foi possível verificar a superioridade da fração DS em relação às demais amostras antigênicas analisadas.

Não foram observadas diferenças significativas entre o extrato S e o LV nos testes ELISA utilizando os extratos totais, embora a sensibilidade do extrato S tenha sido maior que a do LV. A fração DS foi significativamente mais sensível e específica que a fração DLV, como pode ser observado nos valores do IR obtidos no Grupo 1 e no Grupo 3. O perfil de reconhecimento de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* no teste ELISA pelas frações aquosas destes dois extratos totais (S e LV) foi bastante distinto, uma vez que a fração AS foi menos sensível e específica que a fração ALV.

As variações observadas nos testes ELISA podem também estar relacionadas a outros fatores além da amostra antigênica, assim como a heterogeneidade do perfil imunológico de cada um dos pacientes (KO; NG, 1998; GARCIA et al., 1998).

No *immunoblotting* o extrato S e o LV não diferenciaram os pacientes com NC dos pacientes com hidatidose por *E. granulosus*. Embora a fração DS tenha demonstrado uma extensa banda de massa aparente de 50-70 kDa em amostras de soro de pacientes com NC, esta fração ainda apresentou diversas outras bandas sendo reconhecidas pelas amostras de soro de pacientes com hidatidose por *E. granulosus*, esta reatividade cruzada também tem sido demonstrada por outros autores utilizando extratos totais (ISHIDA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007). As bandas de baixo peso moleculares observadas tanto para os extratos totais quanto para as frações destes extratos concordam com os dados de outros autores, onde glicoproteínas de 8 a 50 kDa são descritas como marcadores imunodominantes no diagnóstico da NC (BUENO et al., 2005; FERRER et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007). Quanto à fração ALV e a fração AS, estas foram pouco sensíveis no *immunoblotting*, inviabilizando assim a sua aplicação neste teste.

No *immunoblotting* as bandas de 24 e 26-28 kDa reconhecidas pelas amostras de soro utilizando o LV e a de 24 kDa utilizando a fração ALV, estão entre as glicoproteínas de 10-26 kDa, presentes no líquido vesicular das formas metacestódeas de *T. solium*. Estas glicoproteínas são descritas como imunodominantes no cisticercose (SAKO et al, 2006). A banda de 33 kDa expressa pelo LV e sua fração ALV, têm sido utilizada no diagnóstico de teníase mas não da cisticercose (LEVINE et al., 2004).

As diferenças entre as positivities para as frações DLV e ALV quanto às frações DS e AS podem estar relacionadas ao fato de que após o fracionamento pelo TX-114 as proteínas hidrofílicas são encontradas exclusivamente na fração aquosa, enquanto as proteínas integrais da membrana, de natureza hidrofóbica, são recuperadas na fração detergente

(BORDIER, 1981). Os resultados obtidos indicam que esta técnica de fracionamento não é recomendada para o LV.

Com base nos resultados obtidos quanto à sensibilidade e especificidade apenas o extrato S foi selecionado para fracionamento em colunas de cromatografia com posterior fracionamento pelo TX-114. Em adição, a obtenção de formas metacestódeas íntegras que possibilitem a extração do LV constituem um obstáculo, ao contrário do extrato S onde as formas metacestódeas mesmo rompidas após o congelamento podem ser utilizadas na preparação do extrato S.

No presente estudo a jacalina foi utilizada pela primeira vez no fracionamento do extrato S de formas metacestódeas de *T. solium* no diagnóstico da cisticercose humana. As frações obtidas (FNL-J e FL-J) revelaram um perfil de bandas complementar ao extrato S, ou seja, proteínas presentes no extrato bruto foram também visualizadas nas frações.

Contrário aos resultados descritos por outros autores, a fração de interesse no diagnóstico da cisticercose neste estudo foi a fração não ligante de jacalina (KABIR, 1998; JEYAPRAKASK et al., 2005). Os resultados demonstraram que componentes inespecíficos para o diagnóstico da NC possuem afinidade para a jacalina, deste modo a FNL-J perde alguns componentes que intensificavam as reações inespecíficas. Por este motivo a fração de escolha para uma segunda etapa de fracionamento foi a FNL-J e não a FL-J.

Ambas as frações obtidas através de cromatografia de afinidade em coluna de N-acetil-glicosamina demonstraram baixa eficiência na detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*, apresentando um perfil similar no reconhecimento destes anticorpos. Ao contrário quando foram analisadas as mesmas amostras de soro frente à FL-J foi observado uma diminuição nos níveis de detecção de anticorpos nas amostras de pacientes com NC e uma intensificação da reação nas amostras de pacientes com hidatidose por *E. granulosus*, o mesmo não foi observado para a FNL-J, uma vez que com a utilização desta fração houve uma redução dos níveis de detecção de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium*.

A fração DFNL-J obtida a partir da FNL-J fracionadas com TX-114 demonstrou um perfil semelhante ao perfil da fração DS, interessante a fração submetida aos dois processos de fracionamento resultou em uma fração mais específica, não alterando a sensibilidade. A fração AFNL-J, assim como na fração AS, demonstrou baixa sensibilidade e baixa especificidade, tanto no ELISA quanto no *immunoblotting*, não sendo então recomendada como para aplicação no diagnóstico da cisticercose humana, concordando com Machado et al., (2007), onde a fração aquosa também se mostrou ineficaz.

No fracionamento da FNL-J em coluna de ConA nenhuma das frações obtidas apresentaram resultados satisfatórios no ELISA. Nas reações de *immunoblotting* utilizando estas frações, (FNL-ConA e FL-ConA), não foi possível visualizar marcadores imunodominantes para o diagnóstico da cisticercose humana, sendo assim estas amostras antigênicas não são indicadas para a sua utilização no sorodiagnóstico da cisticercose, especialmente no *immunoblotting*.

O fato da fração DS e a DFNL-J terem apresentado maior sensibilidade e especificidade pode estar relacionada à expressão de bandas com uma faixa entre 50 a 70 kDa, uma vez que a proteína GP 50 está associada com o diagnóstico da cisticercose e tem sido utilizada nos últimos 15 anos nesta área (HANCOCK et al., 2004; FERRER et al., 2007).

Os resultados encontrados para as frações detergentes estão de acordo com o estudo de Bueno et al. (2005) onde a banda de 50 kDa apresentou sensibilidade de 94,7% e especificidade de 93,8% no teste ELISA para diagnóstico da cisticercose humana em amostras de soro.

Resultados falso-negativos observados nos pacientes do Grupo 1 podem ser associados a possíveis calcificações intra-parenquimatosas no SNC ou mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, uma vez que interações parasito-hospedeiro são de natureza complexa em função de antígenos parasitários em diferentes estágios evolutivos, variações genéticas individuais de cada paciente, número de cisticercos e suas diferentes localizações. Todas estas variações podem contribuir para a diminuição da sensibilidade no diagnóstico da NC (MACHADO et al., 1996).

Além disso, os resultados falso-negativos podem também estar associados a casos assintomáticos da doença, uma vez que análises de protocolos de necropsias revelam pacientes com inúmeras calcificações e que, no entanto nunca relataram sintomas característico para NC (REY, 2001b). Zini; Farrel; Wadee, (1990) sugeriram ainda que resultados falso-negativos podem ocorrer em casos onde a doença parenquimal está presente, sugerindo tolerância imunológica ao parasito ou uma baixa produção de anticorpos.

A positividade observada entre algumas amostras de soro de pacientes com outras parasitoses (Grupo 2), possivelmente ocorreu devido à reações cruzadas, fato que ocorre principalmente em áreas endêmicas para cisticercose, conforme demonstrado por vários autores (ZINI; FARREL; WADEE, 1990; GARCIA et al., 1998; GARCIA et al., 2003; ISHIDA et al., 2003; PARIJA, et al., 2004). Bragazza et al. (2002) descreveram 20% de reações cruzadas em 1863 amostras de soro de indivíduos provenientes de áreas endêmicas.

O estudo dos indivíduos do Grupo 2, ou seja de indivíduos infectados por *Taenia* sp. e por outras parasitoses, é importante na análise dos dados porque representa a realidade da população, especialmente em nosso país onde as doenças parasitárias são altamente prevalentes. A reatividade cruzada entre pacientes infectados por *A. lumbricoides* e anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* pode estar relacionadas à infecções concomitantes desses pacientes com ambas as espécies ou a presença de anticorpos remanescentes de infecções prévias, visto que as amostras de soro são provenientes da população do Estado de Minas Gerais, região considerada endêmica para o complexo teníase-cisticercose, conforme dados da literatura (SILVA-VERGARA et al., 1998; SILVEIRA-LACERDA et al., 2002).

Neste estudo a reação cruzada mais freqüente ocorreu em amostras de soro de pacientes com *E. granulosus*, resultados estes também observados por outros autores (ITO; NAKAO; KUTSUMI, 1993; GARCIA et al. 1998). Esta reatividade cruzada está relacionada ao compartilhamento de componentes antigênicos, uma vez que se trata de espécies filogeneticamente próximas (ISHIDA et al., 2003). Um outro fator que pode ter contribuído para esta reatividade pode ser o compartilhamento de epítomos estágio específicos, uma vez que a maioria das amostras de soro de pacientes infectados por *Taenia* sp. foram negativas, concordando com a literatura (MONTENEGRO et al., 1994; CHUNG et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2007; ZHENG et al., 2007).

As frações detergentes (DS e DFNL-J) possibilitaram uma redução nos testes falso positivos e falso negativos, tanto no ELISA quanto no *immunoblotting*, no imunodiagnóstico da neurocisticercose. A fração DFNL-J foi mais sensível e mais específica na reação de *immunoblotting*, sendo a única fração a possibilitar a diferenciação de pacientes com NC de pacientes com hidatidose por *E. granulosus*. Esta fração demonstrou ser bastante eficiente e potencialmente importante no diagnóstico da NC humana. O estudo desta fração pode contribuir na produção de kits diagnósticos, deste modo trazendo conhecimentos aplicáveis para o benefício da sociedade.

6 - CONCLUSÕES

- 1) Neste trabalho foi possível fracionar o extrato S total e o LV das formas metacestódeas de *T. solium* através do TX -114, obtendo quatro frações antigênicas: Detergente (DS e DLV) e Aquosa (AS e ALV).
- 2) A fração DS foi mais específica que o LV e suas respectivas frações (DLV e ALV) na detecção de IgG-anti metacestódeos de *T. solium*.
- 3) A alta especificidade e sensibilidade da fração DS no teste ELISA fazem desta uma importante fonte antigênica potencialmente aplicável no diagnóstico da NC.
- 4) Dentre as frações obtidas pela cromatografia de afinidade a FNL-J foi mais sensível e específica que as frações: FL-J, FL-N, FL-ConA, FNL-N, FNL-ConA.
- 5) No processo de fracionamento da FNL-J pelo TX-114 a fração DFNL-J foi mais sensível e específica que a fração AFNL-J.
- 6) A fração DFNL-J foi o único extrato antigênico, dentre todos os antígenos estudados, capaz de distinguir os pacientes com hidatidose por *E. granulosus* dos pacientes com NC na reação de *immunoblotting*.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- ABREU-E-LIMA, M.C.C.; MELLO, R.V.; CARVALHO, A.R.L.; PORTO, A.; ABREU-E-LIMA, M.C. Cisticercose simulando fibroadenoma da mama: relato de caso. **Jornal Brasileiro de Patologia**, Rio de Janeiro, v.35, n.1, p.37-39, 1999.
- ADITYA, G.S.; MAHADEVAN, A.; SANTOSH, V.; CHICKABASAVIAH, Y.T.; ASHWATHNARAYANARAO, C.B.; KRISHNA, S.S. Cysticercal chronic basal arachnoiditis with infarcts, mimicking tuberculous pathology in endemic áreas. **Neuropathology**, Sendai, v.24, n.4, p.320-325, 2004.
- ALLAN, J.C.; GARCIA-DOMINGUEZ, C.; CRAIG, P.S.; ROGAN, M.T.; LOWE, B.S.; FLISSER, A. Sexual development of *Taenia solium* in hamsters. **Annales of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.85, n.5, p.573-576, 1991.
- ANDERSEN, M.D.; MOLLER, B.L. Double Triton X-114 phase partitioning for the purification of plant cytochromes P450 and removal of green pigments. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v.13, n.3, p.366-372, 1998.
- ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; LESBORDES, J.L.; RASOAHARIMALALA, B.; PEGHINI, M.; RABARIJAONA, L.; ROUX, J.; BOISIER, P. Neurocysticercosis: a major aetiological factor of late-onset epilepsy in Madagascar. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.2, n.8, p.741-746, 1997.
- ANGOTTI-NETO, H.; GONÇALVES, A.C.P.; MOURA, F.C.; MONTEIRO, M.L.R. Extraocular muscle cysticercosis mimicking idiopathic orbital inflammation: case report. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v.70, n.3, p.537-539, 2007.
- ANTONIUK, S. Epidemiología de la neurocisticercosis. **Revista de Neurologia**, São Paulo, v.29, n.4, p.331-333, 1999.
- ANTONIUK, S.A.; BRUCK, I.; SANTOS, L.H.C.; PINTARELLI, V.L.; NAVOLAR, F.B.B.; BRACKMANN, P.C.; MORAIS, R.L. Seizures associated with calcifications and edema in neurocysticercosis. **Pediatric Neurology**, New York, v.25, n.4, p.309-311, 2001.
- AROCKIA, J.A.; JAYASHREE, G.; MAHANTA, S.K.; SWAMINATHAN, C.P.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Structural basis for the energetics of jacalin–sugar interactions: promiscuity versus specificity. **Journal of Molecular Biology**, London, v.347, n.1, p.181–188, 2005.
- ASSANA, E.; KANOBANA, K.; TUME, C.B.; ZOLI, P.A.; NGUEKAM, GEERTS, S.; BERKVENS, D.; DORNY, P. Isolation of a 14 kDa antigen from *Taenia solium* cyst fluid by HPLC and its evaluation in enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of porcine cysticercosis. **Research in Veterinary Science**, London, v.82, n.3, p.370–376, 2007.

* De acordo com:

SILVA, A.M.; PINHEIRO, M.S.F.; FREITAS, N.E. Guia para normatização de trabalhos técnicos-científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses. 4ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2002. 157p.

BANNUR, U.; RAJSHEKHAR, V. Cisternal cysticercosis: a diagnostic problem – a short report. **Neurology India**, Mumbai, v.49, n.2, p.206-208, 2001.

BARCELOS, I.S.C.; MINEO, J.R.; SILVA, D.A.O.; FERREIRA, M.S.; MOURA, L.P.; BIONDI, G.F.; COSTA-CRUZ, J.M. Detection of IgG in cerebrospinal fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes by ELISA and immunoblot assay. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.6, n.3, p.219-226, 2001.

BARCELOS, I.S.C.; FERREIRA, M.S.; MOURA, L.P.; BIONDI, G.F.; COSTA-CRUZ, J.M. Use of the paired samples (cerebrospinal fluid and serum) in immunodiagnostic of active and inactive human neurocysticercosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.4, p.427-429, 2005.

BASSI, G.E.; ISHIKI, D.K.; FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquidiano – considerações sobre o limiar de reatividade. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Rio de Janeiro, v.27, n.2, p.49-52, 1991.

BOPPRE, M.C.P.; WILLE, P.R.; GUARNIERI, R.; REZEK, K.; CARQUEJA, C.; TREVISOL-BITTENCOURT, P.C.; WALZ, J.C.; BIANCHIN, M.; VON WANGENHEIM, A.; CHAVES, M.L.; WALZ, R. Cognitive performance of patients with epilepsy and calcified neurocysticercosis lesions: a case-control study. **Epilepsy and Behavior**, San Diego, v.2, n.6, p.558-562, 2001.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.256, n.4, p.1604-1607, 1981.

BRAGAZZA, L.M.; VAZ, A.J.; PASSOS, A.D.C.; TAKAYANAGUI, O.M.; NAKAMIURA, P.M.; ESPÍNDOLA, N.M.; PARDINI, A.; BUENO, E.C. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural brazilian community (Cássia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.44, n.1, p.7-12, 2002.

BRICKER, T.M., PREVOST, M., Vu, V., LABORDE, S., WOMACK, J., FRANKEL, L.K. Isolation of luminal proteins from spinach thylakoid membranes by Triton X-114 phase partitioning. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1503, n.3, p.350-356, 2001.

BUCARDO, F.; MEZA-LUCAS, A.; ESPINOZA, F.; GARCÍA-JERÓNIMO, R.C.; GARCÍA-RODEA, R.; CORREA, D. The seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis among epileptic patients in Leon, Nicaragua, as evaluated by ELISA and western blotting. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.99, n.1, p.41-45, 2005.

BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.D.; LIVRAMENTO, J.A. Neurocysticercosis: detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.58, n.1, p.18-24, 2000.

BUENO, E.C.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; VAZ, A.J. Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases). **Acta Tropica**, Amsterdam, v.91, n.2, p.205-213, 2004.

BUENO, E.C.; SCHEEL, C.M.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; TAKAYANAGUI, O.M.; TSANG, V.C.; HANCOCK, K. Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.72, n.3, p.278-283, 2005.

CAMPOS-OLIVAS R, HÖRR I, BORMANN C, JUNG G, GRONENBORN AM. Solution structure, backbone dynamics and chitin binding of the anti-fungal protein from *Streptomyces tendae* TU901. **Journal of Molecular Biology**, London, v.308, n.4, p.765-82, 2001.

CANELAS, H.M. Neurocisticercose: incidência, diagnóstico e formas clínicas. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.20, p.1-16, 1962.

CANELAS, H.M. Cisticercose do SNC. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.47, p.75-89, 1963.

CARPIO, A. Neurocysticercosis: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v.2, n.12, p.751-762, 2002

CARPIO, A.; ESCOBAR, A.; HAUSER, W.A. Cysticercosis and epilepsy: A critical review. **Epilepsia**, New York, v.39, n.10, p.1025-1040, 1998.

CASTILLO, M. Imaging of neurocysticercosis. **Seminars in Roentgenology**, Madison, v.39, n.4, p.465-473, 2004.

CASTILLO-IGLESIAS, H.; MOULY, S.; DUCROS, A.; SARFATI, C.; SULAHIAN, A.; BERGMANN, J.F.; Late-onset eosinophilic chronic meningitis occurring 30 years after *Taenia solium* infestation in a white Caucasian woman. **The Journal of Infection**, Kent, v.53, n.1, p.35-38, 2006.

CHATURVEDI, V.; GUPTA, H.P. Evaluation of integral membrane antigens of *Mycobacterium habana* for serodiagnosis of extrapulmonary tuberculosis: association between levels of antibodies and *Mycobacterium tuberculosis* antigens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.33, n.1, p.1-7, 2001.

CHAVES-BORGES, F.A., MINEO, J.R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55pp.

CHAWLA, S.; GUPTA, R.K.; KUMAR, R.; GARG, M.; PRADHAN, S.; PAL, L.; HUSAIN, N.; GUPTA, A.; RATHORE, R.K.S. Demonstration of scolex in calcified cysticercus lesion using gradient echo with or without corrected phase imaging and its clinical implications. **Clinical Radiology**, Oxford, v.57, n.9, p.826-834, 2002.

CHUNG, J.Y.; YUN, D.H.; EOM, K.S.; KANG, S.Y.; KONG, Y.; CHO, S.Y. *Taenia solium*: identification of specific antibody binding regions of metacestode 10-kDa protein. **Experimental Parasitology**, Orlando, v.100, n.2, p.87-94, 2002.

COLLÉN, A.; PERSSON, J.; LINDER, M.; NAKARI-SETÄTÄ, T.; PENTTILÄ, M.; TJERNELD, F.; SIVARS, U.IF. A novel two-step extraction method with detergent/polymer systems for primary recovery of the fusion protein endoglucanase I-hydrophobin I. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1569, n.1-3, p.139-150, 2002.

- CORTEZ, M.A.; GIULIARI, G.P.; ESCAF, L.; ESCAF, S.; VIDAL, C. Ocular cysticercosis of the anterior segment. **Journal of AAPOS - American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus**. St. Louis, v.11, n.6, p.628-629, 2007.
- COSTA, J. M. 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. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.44, n.1, p.15-31, 1986.
- COSTA, J.M.; FERREIRA, A.W.; MAKINO, M.M.; CAMARGO, M.E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.24, n.6, p.337-341, 1982.
- COSTA, J.M.; MINEO, J.R.; LIVRAMENTO, J.A.; CAMARGO, M.E. Detecção pelo teste imunoenzimático ELISA de anticorpos IgM anti-*Cysticercus cellulosae* no líquido cefalorraqueano na neurocisticercose. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.43, n.1, p.22-28, 1985.
- COSTA-CRUZ, J. M. Diagnóstico imunológico da cisticercose. Anais XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia. **Sociedade Brasileira de Parasitologia**, p.105-106, 1995.
- COSTA-CRUZ, J.M.; ROCHA, A.; SILVA, A.M.; MORAIS, A.T.; GUIMARÃES, A.H.B.; SALOMÃO, E.C.; ALCÂNTARA, T.M. Ocorrência de cisticercose em necropsias realizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.53, n.2, p.227-232, 1995.
- CUÉLLAR, R.; MOLINERO, M.; RAMÍREZ, F.; VALLEJO, V. Manifestaciones clínicas de la neurocisticercosis cerebral activa em pediatria. **Revista de Neurologia**, São Paulo, v.29, n.4, p.334-337, 1999.
- CUNNINGHAM, B.A.; WANG, J.L.; WAXDAL, M.J.; EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogens bromide fragment F3. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.250, n.4, p.1503-1512, 1975.
- DEGIORGIO, C.; ESCUETA-PIETSCH, S.; TSANG, V.; CORRAL-LEYVA, G.; NG, L.; MEDINA, M.T.; ASTUDILLO, S.; PADILLA, N.; LEYVA, P.; MARTINEZ, L.; NOH, J.; LEVINE, M.; DEL VILLASEÑOR, R.; SORVILLO, F. Sero-prevalence of *Taenia solium* cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in California, USA. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v.111, n. 2, p.84-88, 2005.
- DEL BRUTTO, O.H.; SOTELO, J. Etiopatogenia de la neurocisticercosis. **Revista Ecuatoriana de Neurologia**, Guayaquil, v.2, p.22-32, 1993.
- DEL BRUTTO, O.H.; WADIA, N.H.; DUMAS, M.; CRUZ, M.; TSANG, V.C. W.; SCHANTZ, P. M. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v.142, n.1-2, p. 1-6, 1996.
- DEL BRUTTO, O.H.; RAJSHEKHAR, V.; WHITE, A.C. JR; TSANG, V.C.; NASH, T.E.; TAKAYANAGUI, O.M.; SCHANTZ, P.M.; EVANS, C.A.; FLISSER, A.; CORREA, D.; BOTERO, D.; ALLAN, J.C.; SARTI, E.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; GARCÍA, H.H.; Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, Hagerstown, v.57, n.2, p.177-183, 2001.

DEKUMYOY, P.; WAIKAGUL, J.; VANIJANONTA, S.; THAIRUNGROJ, M.; NAKAO, M.; SAKO, Y.; WATANABE, S.; ITO, A. Cysticercosis: IgG-ELISA evaluations of peak1 antigen and <30 Kda antigen of delipidized extract of *Taenia solium* metacestodes. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine of Public Health**, Bangkok, v.35, n.1, p.1-9, 2004.

DELGADO-AZAÑERO, W.A.; MOSQUEDA-TAYLOR, A.; CARLOS-BREGNI, R.; MURO-DELGADO, R.D.; DÍAZ-FRANCO, M.A.; CONTRERAS-VIDAURRE, E. Oral cysticercosis: a collaborative study of 16 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v.103, n.4, p.528-533, 2007.

DIOP, A.G.; BOER, H.M.; MANDLHATE, C.; PRILIPKO, L.; MEINARDI, H. The global campaign against epilepsy in Africa. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.149-159, 2003.

DORNY, P.; BRANDT, J.; ZOLI, A.; GEERTS, S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.79-86, 2003.

DUA, T.; ANEJA, S. Neurocysticercosis: management issues. **Indian Pediatrics**, New Delhi, v.43, n.3, p.227-235, 2006.

DURHAM, M.; REGNIER, F.E. Targeted glycoproteomics: Serial lectin affinity chromatography in the selection of *O*-glycosylation sites on proteins from the human blood proteome. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1132, n.1-2, p.165-173, 2006.

EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REECK, G.N.; BECKER, J.W.; WAXDAL, M.W.; WANG, J.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.69, n.9, p.2580-2584, 1972.

ESPINOZA, B.; RUIZ-PALACIOS, G.; TOVAR, A.; SANDOVAL, M.A.; PLANCARTE, A.; FLISSER, A. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.24, n.4, p.536-541, 1986.

ESTEVEZ, F.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; SILVA-VERGARA, M.L. Inquérito epidemiológico sobre teníase em população do PSD no município de Uberaba, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.38, n.6, p.530-531, 2005.

FAÇANHA, M.C. Casos de cisticercose em pacientes internados pelo Sistema Único de Saúde: distribuição no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, n.5, p.484-487, 2006.

FERREIRA, M.S.; COSTA-CRUZ, J.M.; NISHIOKA, S.A.; MANTESE, O.C.; CASTRO, E.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; MOURA, L.P. Neurocysticercosis in Brazilian children: report of 10 cases. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v.45, n.1, p.49-50, 1994.

FERRER, E.; BENITEZ, L.; FOSTER-CUEVAS, M.; BRYCE, D.; WAMAE, L.W.; ONYANGO-ABUJE, J.A.; GARATE, T.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.111, n.1, p.83-94, 2003.

FERRER, E.; BONAYD, P.; FOSTER-CUEVAS, M.; GONZÁLEZ, L.M.; DÁVILA, I.; MARÍA MILAGROS CORTÉZ, M.M.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GÁRATE, T. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.152, n.1, p.90-100, 2007.

FLISSER, A.; ESPINOZA, B.; TOVAR, A.; PLACARTE, A.; CORREA, D. Host-parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.20, n.1-3, p.95-102, 1986.

FLISSER, A.; SARTI, E.; LIGHTOWLERS, M.; SCHANTZ, P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Américas. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.43-51, 2003.

FLISSER, A.; VARGAS-PARADA, L.; LACLETTE, J.P. *Taenia solium*: um parasito cosmopolita. **Investigación Y Ciência**, España, p.24-33, 2006.

FORLENZA, O. V.; VIEIRA-FILHO, A. H.; MACHADO, L.R.; NOBREGA, J. P.; BARROS, N. G. Depressive disorders associated with neurocysticercosis: prevalence and clinical correlations. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.56, n.1, p.45-52, 1998.

FRIEDMAN, R.D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.126, n.2, p.346-349, 1982.

GAMANAGATTI, H.S.; SRIVASTAVA, D.N.; VENKATESH, P. Imaging feature of optic nerve cysticercosis. **Clinical Radiology Extra**, Oxford, v.58, n.4, p.27-28, 2003.

GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO, O.H. *Taenia solium* cysticercosis. **Infectious Disease Clinics North America**, Philadelphia, v.14, n.1, p.97-119, 2000.

GARCIA, H.H.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; MONTENEGRO, T.; MARTINEZ, S.M.; TSANG, V.C.W.; GILMAN, R.H. Cysticercosis Working Group in Peru. A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.92, n.4, p.411-414, 1998.

GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO, O.H. Imaging finding in neurocysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.71-78, 2003.

GARCIA, H.H.; GONZÁLEZ, A.E.; EVANS, C.A.W.; GILMAN, R.H. *Taenia solium* cysticercosis. **The Lancet**, London, v.361, n.9383, p.547-556, 2003.

GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO, O.H.; NASH, T.E.; WHITE Jr, A.C.; TSANG, V.C.; GILMAN, R.H. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.72, n.1, p.3-9, 2005.

GARG, R.K.; DESAI, P.; KAR, M.; KAR, A.M. Multiple ring enhancing brain lesions on computed tomography: An Indian perspective. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v.266, n.1-2, p.92-96, 2007.

- GAUCI, C.G.; LIGHTOWLERS, M.W. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium*, with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.112, n.2, p.173-181, 2001.
- GENNARI-CARDOSO, M.L. **Paracoccina: lectina de Paracoccidioides brasiliensis ligante de N-acetil-glicosamina interage com componente de matriz extracelular**. 2000. Tese de Doutorado, Depto de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2000.
- GEVORKIAN, G.; MANOUTCHARIAN, K.; LARRALD, C.; HERNANDEZ, M.; ALMAGRO, J.C.; VIVEROS, M.; SOTELO, J.; GARCÍA, E.; SCIUTTO, E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. **Immunology Letters**, Amsterdam, v.49, n.3, p.185-189, 1996.
- GONZÁLEZ, A.E.; GARCÍA, H.H.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W. Control of *Taenia solium*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.103-109, 2003.
- GOTTSTEIN, B.; TSANG, V. C. W.; SCHANTZ, P. M. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.35, n.2, p.308-313, 1986.
- GREINER, M.; SOHR, D.; GÖBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.185, n.1, p.123-132, 1995.
- GREWAL, J.S.; KAUR, S.; BHATTI, G.; SAWHNEY, I.M.; GANGULY, N.K.; MAHAJAN, R.C.; MALLA, N. Cellular immune responses in human neurocysticercosis. **Parasitology Research**, Berlin, v.86, n.6, p.500-503, 2000.
- GURHA, N.; SOOD, A.; DHAR, J.; GUPTA, S. Optic nerve cysticercosis in the optic canal. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, Oxford, v.77, n.1, p.107-109, 1999.
- HAMED, S.A.; EL-METAAL, H.E. Unusual presentations of neurocysticercosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v.115, n.3, p.192-198, 2007.
- HANCOCK, K.; PATTABHI, S.; GREENE, R.M.; YUSHAK, M.L.; WILLIAMS, F.; KHAN, A.; PRIEST, J.W.; LEVINE, M.Z.; TSANG, V.C.W. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.133, n.1, p.115-124, 2004.
- HAWK, M.W.; SHAHLAIE, K.; KIM, K.D.; THEIS, J.H. Neurocysticercosis: a review. **Surgical Neurology**, New York, v.63, n.2, p.123-132, 2005.
- HÉNAFF, M.L.; CRÉMET, J.-Y.; FONTENELLE, C. Purification and characterization of the major lipoprotein (P28) of *Spiroplasma apis*. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v.24, n.3, p.489-496, 2002.
- HERMANSON, G.T.; MATTSON, G.R.; KROHN, R.I. Preparation and use of immunoglobulin-binding affinity supports on Emphaze beads. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.691, n.1-2, p.113-122, 1995.

- HOFFMANN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis *mansoni*. **Puerto Rico Journal of Public Health**, Puerto Rico, v.9, p.283-291, 1934.
- HUANG, H.; XIE, W.; CONG, A. Characteristics and antigungal activity of a chitin binding protein from ginkgo biloba. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.478, n.1-2, p.123-126, 2000.
- HUSAIN, N.; SHUKLA, N.; KUMAR, R.; HUSAIN, M.; CHATURVEDI, A.; AGARWAL, G.G.; GUPTA, R.K. ELISA in the evaluation of therapeutic response to albendazole in neurocysticercosis. **The Journal of Infection**, Kent, v.56, n.1, p.65-73, 2008.
- ISHIDA, M.M.I.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A.W.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A.J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.89, n.1, p.73-84, 2003.
- ITO, A. Serologic and molecular diagnosis of zoonotic larval cestode infections. **Parasitology International**, Amsterdam, v.51, n.3, p.221-235, 2002.
- ITO, A.; NAKAO, M.; KUTSUMI, H. Serodiagnosis of alveolar hydatid disease by western blotting. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.87, n.2, p.170-172, 1993.
- ITO, A.; PLACARTE, A.; MA, L.; KONG, Y.; FLISSER, A.; CHO, S.Y.; LIU, Y.H.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M.W.; SCHANTZ, P.M. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.59, n.2, p.291-294, 1998.
- ITO, A.; PLACARTE, A.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; IKEJIMA, T.; PIAO, Z.X.; KANAZAWA, T.; MARGONO, S.S. ELISA and immunoblot using purified glycoproteins for serodiagnosis of cysticercosis in pigs naturally infected with *Taenia solium*. **Journal of Helminthology**, London, v.73, n.4, p.363-365, 1999.
- JAY, A.; DHANDA, J.; CHIODINI, P.L.; WOODROW, C.J.; FARTHING, P.M.; EVANS, J.; JAGER, H.R. Oral cysticercosis. **The British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Edinburgh, v.45, n.4, p.331-334, 2007.
- JEYAPRAKASH, A.A.; JAYASHREE, G.; MAHANTA, S.K.; SWAMINATHAN, C. P.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Structural basis for the energetics of jacalin-sugar Interactions: promiscuity versus specificity. **Journal of Molecular Biology**, London, v.347, n.1, p.181-188, 2005.
- JIANG, J.L.; PENG, Y.; OIU, Y.; WANG, J. Effect of endogenous catecholamines on apoptosis of Con A-activated lymphocytes of rats. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v.192, n.1-2, p.79-88, 2007.
- KABIR, S. Jacalin: a jackfruit *Artocarpus heterophyllus*/seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.212, n.2, p.193-211, 1998.
- KO, R.C.; NG, T.F. Specific of isoelectric focusing-purified antigens in the diagnosis of human cysticercosis. **Parasitology Research**, Berlin, v.84, n.7, p.565-569, 1998.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Basingstoke, v.227, n.15, p.680-685, 1970.
- LARRALDE, C.; LACLETTE, J.P.; OWEN, C.S.; MADRAZO, I.; SANDOVAL, M.; BOJALK, R.; SCIUTTO, E.; CONTRERAS, L.; ARZATE, J.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T.; MONTOYA, R.M.; GOODSID, F. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.35, n.5, p.965-973, 1986.
- LARRALDE, C.; MONTOYA, R.M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T.; COLTORTI, E. 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**, Northbrook, v.40, n.3, p.282-290, 1989.
- LEVINE, M.Z.; CALDERON, J.C.; WILKINS, P.P.; LANE, W.S.; ASARA, J.M.; HANCOCK, K.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C. Characterization, cloning and expression of two diagnostic antigens for *Taenia solium* tapeworm infection. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v.90, n.3, p.631-638, 2004.
- LIMA, J.E.P.; WALZ, R.; TORT, A.; SOUZA, D.; PORTELA, L.; BIANCHIN, M.M.; TAKAYANAGUI, O.M.; LEITE, J.P. Serum and cerebrospinal fluid S-100B concentrations in patients with neurocysticercosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 39, n. 1, p.129-135, 2006.
- LINO JUNIOR, R.S. ; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P. A. Ocorrência de cisticercose (*Cysticercus cellulosae*) encefálica e cardíaca em necropsias. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.33, n.5, p.495-498, 1999.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.55, p.35-67, 1986.
- LOMBARDO, J. Subretinal cysticercosis. **Optometry and Vision Science**, Hagerstown, v.78, n.4, p.188-194, 2001.
- LONARDONI, M.V.C.; BERTOLINI, D.A.; SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CARDOSO, R.F.; GOMES, M.L.; DIAS, M.L.G.G.; VISENTAINER, J.E.L.; MISUTA, N.M.; RAMOS, M.; SIQUEIRA, V.L.D. Frequência de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em indivíduos de cinco municípios da região Norte do Estado do Paraná – Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.30, n.3, p.273-279, 1996.
- LOWRY, V.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.
- MACEDO, H.W.; PERALTA, R.H.S.; CIPRIANO, A.; SARMENTO, M.R.; VAZ, A.J.; PERALTA, J.M. Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.38, n.2, p.93-103, 2002.
- MACHADO, A.J.; CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S. Reação de imunofluorescência para a cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas a lâminas de microscopia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.7, p.181-183, 1973.

MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; SPINA-FRANÇA NETTO, A.; NÓBREGA, J.P.S. (Ed.). **Neuroinfecção 96**. São Paulo: HC/FMUSP-Clinica Neurológica, 1996, 324p.

MACHADO, G.A.; SANTIAGO, F.M.; MINEO, J.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.12, n.11, p.1369-1376, 2007.

MAFOJANE, N.A.; APPLETON, C.C.; KRECEK, R.C.; MICHAEL, L.M.; WILLINGHAM, A.L. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.25-33, 2003.

MAHAJAN, D.; KHURANA, N.; SETIA, N. Coexistence of salivary gland cysticercosis with squamous cell carcinoma of the mandible. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v.103, n.3, p.47-50, 2007.

MAMERE, A.E.; MUGLIA, V.F.; SIMAO, G.N.; BELLUCI, A.D.; SANTOS, A.C.; TRAD, C.S.; TAKAYANAGUI, O.M. Disseminated cysticercosis with pulmonary involvement. **Journal of Thoracic Imaging**, Philadelphia, v. 19, n. 2, p. 109-111, 2004.

MANZOORI, J.L.; BAVILI-TABRIZI, A. Cloud point preconcentration and flame atomic absorption spectrometric determination of Cd and Pb in human hair. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.470, n.2, p.215-221, 2002.

MAZHARI, N.J.; KUMAR, N.; JAIN, S. Cysticercosis of the oral mucosa: aspiration cytologic diagnosis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v.30, n.3, p.187-189, 2001.

MEDINA, M.T.; DURON, R.M.; MARTINEZ, L.; OSORIO, J.R.; ESTRADA, A.L.; ZUNIGA.C.; CARTAGENA, D.; COLLINS, J.S.; HOLDEN, K.R. Prevalence, incidence, and etiology of epilepsies in rural Honduras: the Salama Study. **Epilepsia**, Malden, v.46, n.1, p.124-131, 2005.

MILLER, B.; GOLDBERG, M.A.; HEINER, D.; MYERS, A.; GOLDBERG, A. A new immunologic test for CNS cysticercosis. **Neurology**, Hagerstown, v.34, n.5, p.695-697, 1984.

MINEO, J.R.; SILVA, D.A.O.; SOPELETE, M.C.; LEAL, G.S.; VIDIGAL, L.H.G.; TÁPIA, L.E.R.; BACCHIN, M.I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU: Editora da Universidade Federal de Uberlândia, 2005. 273p.

MONTENEGRO, T.; GILMAN, R.; CASTILLO, R.; TSANG, V.; BRANOT, J.; GUEVARA, A.; SANABRIA, H.; VERASTEGUI, M.; STERLING, C.; MIRANDA, E. The diagnostic importance of species specific and cross-reactive components of *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Hymenolepis nana*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.36, n.4, p.327-334, 1994.

MUKARATIRWA, S.; KASSUKU, A.A.; WILLINGHAM, A.L.; MURRELL, K.D. Background to the international action planning workshop on *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis with special focus on Eastern and Southern Africa. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.3-5, 2003.

NASH, T.E.; NEVA, F.A. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.311, n.23, p.1492-1495, 1984.

NG, T.F.; KO, R.C. Serodiagnosis of cysticercosis: specificity of different antigens and enzyme-linked immunosorbent assays. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.88, n.4, p.421-422, 1994.

NIGAM, S.; GHOSH, P.C.; SARMA, P.U. A new glycoprotein allergen/antigen with the protease activity from *Aspergillus fumigatus*. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.132, n.2, p.124-131, 2003.

ODASHIMA, N.S.; TAKAYANAGUI, O.M.; FIGUEIREDO, J.F. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG, IgM, IgE and IgA against *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.60, n.2B, p.400-405, 2002.

OGILVIE, C.M.; KASTEN, P.; ROVINSKY, D.; WORKMAN, K.L.; JOHNSTON, J.O. Cysticercosis of the triceps – an unusual pseudotumor: case report and review. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.382, n.1, p.217-221, 2001.

OLIVEIRA, H.B.; RODRIGUES, R.M.; BARCELOS, I.S.C.; SILVA, L.P.; COSTA-CRUZ, J.M. Anti-*Taenia solium* metacestode IgG antibodies in serum samples from inhabitants of a central-western region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v.48, n.1, p.49-52, 2006.

OLIVEIRA, H.B.; MACHADO, G.A.; CABRAL, D.D.; COSTA-CRUZ, J.M. Application of *Taenia saginata* metacestodes as alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. **Parasitology Research**, Berlin, v.101, n.4, p.1007-1113, 2007.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. **Epidemiología y control de la teniasis / cisticercosis em América Latina**: v.3, 1994.

PANDEY, P.K.; CHAUDHURI, Z.; BHATIA, A. Extraocular muscle cysticercosis presenting as brown syndrome. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v.131, n.4, p.526-527, 2001.

PARDINI, A.X.; PERALTA, R.H.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; PERALTA, J.M. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.9, n.1, p.190-193, 2002.

PARIJA, M.; BISWAS, R.; HARISH, B.N.; PARIJA, S.C. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.92, n.3, p.253-260, 2004.

PAWLOWSKI, Z. Taeniasis and Cysticercosis (*T. saginata*). **Advances in Parasitology**, London, v.10, p.269-343, 1972.

PEDRETTI JUNIOR, L.P.; BEDAQUE, E.A.; MORALES, J.S.; DEL BRUTTO, O. H. Cisticercose. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Ed.). **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997, v.2, p.1332-1344.

PÊSSOA, S.B.; MARTINS, S.V. **Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, p.448-464.

- PHIRI, I.K.; NGOWI, H.; AFONSO, S.; MATENGA, E.; BOA, M.; MUKARATIRWA, S.; GITHIGIA, S.; SAIMO, M.; SIKASUNGE, C.; MAINGI, N.; LUBEGA, G.W.; KASSUKI, A.; MICHAEL, L.; SIZIYA, S.; KRECEK, R.C.; NOORMAHOMED, E.; VILHENA, M.; DORNY, P.; WILLINGHAM, A.L. The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern and Southern África as a serious agricultural problem and public health risk. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.13-23, 2003.
- PITELLA, J.E. Neurocysticercosis. **Brain Pathology**, Zurich, v.7, n.1, p.681-693, 1997.
- PRABHAKARAN, V.; RAJSHEKHAR, V.; MURRELL, K.D.; OOMMEN, A. *Taenia solium* metacestodes glycoproteins as diagnostic antigens for solitary cysticercus granuloma in Indian patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.98, n.8, p.478-484, 2004.
- PROAÑO-NARVAEZ, J.V.; MEZA-LUCAS, A.; MATA-RUIZ, O.; GARCÍA-JERÓNIMO, R.C.; CORREA, D. Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n.6, p.2115-2118, 2002.
- PUCCIONI-SOHLER, M.; MACHADO, L.R.; CANUTO, R.; TAKAYANAGUI, O.M.; ALMEIDA, S.M.; LIVRAMENTO, J.A. Coleta do líquido cefalorraquidiano, termo de consentimento livre e esclarecido e aspectos éticos em pesquisa - Recomendações do Departamento Científico de LCR da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.60, n.3-A, p.681-684, 2002.
- PUSHKER, N.; BAJAJ, M.S.; BETHARIA, S.M. Orbital and adnexal cysticercosis. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, Carlton, v.30, n.5, p.322-333, 2002.
- PUSHKER, N.; BAJAJ, M.S.; BALASUBRAMANYA, R. Disseminated cysticercosis involving orbit, brain and subcutaneous tissue. **Journal of Infection**, Kent, v.51, n.5, p.245-248, 2005.
- RAJKOTIA, Y.; LESCANO, A.G.; GILMAN, R.H.; CORNEJO, C.; GARCIA, H.H. Economic burden of neurocysticercosis: results from Peru. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.101, n.8, p.840-846, 2007.
- RESTREBO, B.I.; AGUILAR, M.I.; MELBY, P.C.; TEALE, J.M. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.65, n.4, p.366-370, 2001.
- REY, L. Tênia e teníases. In: **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2001a. cap. 38, p.496-509.
- REY, L. Cisticercose humana. In: **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2001b. cap. 39, p.510-519.
- ROBINSON, P.; ATMAR, R.L.; LEWIS, D.E.; WHITE Jr, A.C.. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.65, n.7, p.2925-2931, 1997.
- ROCHA, M.S.G.; BRUCKI, S.M.D.; FERRAZ, A.C.; PICCOLO, A.C. Doença cerebrovascular e neurocisticercose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.59, n.3B, p.778-783, 2001.

- RODRIGUES, V. Jr.; MELO, F.A.; MAGALHÃES, E.P.; RIBEIRO, S.B.F.; MARQUEZ, J.O. Interleukin-5 and interleukin-10 the major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.33, n.9, p.1059-1063, 2000.
- ROMÁN, G.; SOTELO, J.; del BRUTTO, O.; FLISSER, A.; DUMAS, M.; WADIA, N.; BOTERO, D.; CRUZ, M.; GARCIA, H.; de BITTENCOURT, P.R.M.; TRELLES, L.; ARRIAGADA, C.; LORENZANA, P.; NASH, T.E.; SPINA-FRANÇA, A. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.78, n.3, p. 399-406, 2000.
- ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: an IgA binding lectin. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.134, n.3, p.1740-1743, 1985.
- SA, D.S.; TEIVE, H.A.; TROIANO, A.R.; WERNECK, L.C. Parkinsonism associated with neurocysticercosis. **Parkinsonism Related Disorders**, Kidlington, v.11, n.1, p.69-72, 2005.
- SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; YAMASAKI, H.; ITO, A. Recombinant antigens for serodiagnosis of cisticercosis and echinococcosis. **Parasitology Internacional**, Amsterdam, v.55, Suppl.69-73, p.569-573, 2006.
- SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; RUGIERO, E.; CONTRERAS, M. del C. Diagnóstico de la neurocisticercosis humana mediante ELISA-IgG usando un antígeno purificado. **Boletín Chileno de Parasitología**, Santiago, v.51, n.3-4, p.85-90, 1996.
- SANCHEZ, A.L.; LJUNGSTRÖM, I.; MEDINA, M.T. Diagnosis of human neurocysticercosis in endemic countries: a clinical study in Honduras. **Parasitology Internacional**, Amsterdam, v.48, n.1, p.81-89, 1999.
- SARTI, E.; RAJSHEKHAR, V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.137-143, 2003.
- SASTRY, M.V.; BANARJEE, P.; PATANJALI, S.R.; SWAMY, M.J.; SWARNALATHA, G.V.; SUROLIA, A. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-D-Gal(1---3)D-GalNAc). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.261, n.25, p.11726-11733, 1986.
- SATO, M.O.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; YAMASAKI, H.; NAKAYA, K.; ITO, A. Evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.194, n.12, p.1783-1790, 2006.
- SCHANTZ, P.; TSANG, V.C.W. The US Centers for Disease Control and prevention (CDC) and research and control of cysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.161-163, 2003.
- SCHER, M.G.; RESNECK, W.G.; BLOCH, R. Stabilization of immobilized lectin columns by crosslinking with glutaraldehyde. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.177, n.1, p.168-171, 1989.
- SCHWAN, E.V.; SCALLY, M.P.; RENSBURG, C.L.; DURAND, D.T. Cerebral cysticercosis in a cat. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v.73, n.4, p.219-221, 2002.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LACLETTE, J.P.; SOTELO, J.; ALUJA, A.; VARGAS, L.; LARRALDE, C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, n.15, p.1875-1890, 2000.

SCRIBA, G.K.E. Affinity chromatography. In: DINGERMAN, T.; STEINHILBER, D.; FOLKERS, G. **Molecular Biology in Medical Chemistry**, 1.ed, Washington: Wiley-VCH, 2004, p.211-241.

SHARMA, T.; SINHA, S.; SHAH, N.; GOPAL, L.; SHANMUGAN, M.P.; BHENDE, P.; BHENDE, M.; SHETTY, N.S.; AGRAWAL, R.; DESHAPANDE, D. Intraocular cysticercosis: clinical characteristics and visual outcome after vitreoretinal surgery. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.110, n.5, p.996-1004, 2003.

SHIGUEKAWA, K.Y.M.; MINEO, J.R.; MOURA, L.P.; COSTA-CRUZ, J.M. ELISA and Western Blotting tests in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.5, n.6, p.443-449, 2000.

SHORT, J.A.; HEINER, D.C.; HSIAO, R.L.; ANDERSEN, F.L. Immunoglobulin E and G4 antibodies in cysticercosis. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.28, n.7, p.1635-1639, 1990.

SICKEL, J.Z.; FULTZ, P.J.; PENWARDEN, B.; LACZIN, J. Hepatic cysticercosis: report of an unusual case. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v.20, n.2, p.160-163, 1995.

SILVA, M.R.; SILVA, M.A.A.P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.1, p.3-9, 2000.

SILVA, J.E.P.; VAZ, A.J.; REIS, M.L.A.; DIAS, M.L.; REIS FILHO, J.B. Desempenho do teste ELISA-“conta” na rotina laboratorial para o diagnóstico da neurocisticercose humana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.32, n.4, p.261-264, 2000.

SILVA-VERGARA, M.L.; VIEIRA, C.O.; CASTRO, J.H.; MICHELLETTI, L.G.; OTANO, A.S.; FRANQUINI JÚNIOR, J.; PRATA, A. Aspectos epidemiológicos da teníase-cisticercose na área endêmica de Lagamar, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.28, n.4, p.345-349, 1995.

SILVA-VERGARA, M.L.; PRATA, A.; VELLOSO NETTO, H.S.; FRANQUINI JÚNIOR, J.; VIEIRA, C.O.; CASTRO, J.H.; MICHELLETTI, L.G.; OTANO, A.S. Risk factors associated with taeniasis-cysticercosis in Lagamar, Minas Gerais State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, n.1, v.31, p.65-71, 1998.

SILVA, A.D.; QUAGLIATO, E.M.; ROSSI, C.L. A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis using a purified fraction from *Taenia solium* cysticerci. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.37, n.2, p.87-92, 2000.

SILVA, A.C.; SILVEIRA, L.S.; SANTOS, A.S.O.; LEMOS, L.S.; MATOS, W.R.; MOREIRA, L.; CARVALHO, E.C.Q. Cisticercose (*Cysticercus cellulosae*) canina generalizada. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.5, n.4, p.195-198, 2004.

- SILVEIRA-LACERDA, E.P.; MACHADO, E.R.; ARANTES, S.C.F; COSTA-CRUZ, J.M. Anti-*Taenia solium* metacestodes antibodies in serum from blood donors from four cities of Triângulo Mineiro area, Minas Gerais, Brazil, 1995. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v.44, n.4, p.229-231, 2002.
- SIMAC, C.; MICHEL, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; ESTERRE, P.; MICHAULT, A. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzymelinked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 81, n.2, p.132–136, 1995.
- SINGHI, P.; SINGHI, S. Neurocysticercosis in children. **Journal of Child Neurology**, Hamilton, v.19, n.7, p.482-492, 2004.
- SOTELO, J.; GUERRERO, V.; RUBIO, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. **Archives of internal medicine**, Chicago, v.145, n.3, p.442-445, 1985.
- SOUSA, A.Q.; SA, H.L.; QUEIROZ, T.R.; HORTA, W.G.; PEARSON, R.D. Neurocysticercosis in Ceara State, northeastern Brazil: a review of 119 cases. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.58, n.6, p.759-62, 1998.
- SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.51, n.1, p.16-20, 1993.
- SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; BACHESCHI, L.A.; GARCÍA-LOPES, P. Cerebrospinal fluid immunoglobulins in cysticercosis of the central nervous system. **Neurología, neurocirugía, psiquiatria**, México, v.18, Suppl:2-3, p.413-420, 1977.
- STOEVA, S.; FRANZ, M.; WACKER, R.; KRAUSPENHAAR, R.; GUTHÖHRLEIN, E.; MIKHAILOV, A.; BETZEL, C.; VOELTER, W. Primary structure, isoforms, and molecular modeling of a chitin-binding mistletoe lectin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.392, n.1, p.23-31, 2001.
- STRYER, L.; TYMOCZKO, J.L.; BERG, J.M. **Bioquímica**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004, 1059 p.
- SUDEWI, A.A.R.; WANDRA, T.; ARTHA, A.; NKOUAWA, A.; ITO, A. *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia: serology and mtDNA analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.102, n.1, p.96-98, 2008.
- SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalina A. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.32, n.2, p.227-237, 1936.
- TAKAYANAGUI, O.M.; CHIMELLI, L. Disseminated muscular cysticercosis with myositis induced by praziquantel therapy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.59, n.6, p.1002-1003, 1998.
- TAKAYANAGUI, O.M. ; SILVA, A.A.C.; SANTIAGO, R.C.; ODASHIMA, N.S.; TERRA, V.C.; TAKAYANAGUI, A.M.M. Notificação compulsória da cisticercose em Ribeirão Preto - SP. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.54, n.4, p.557-564, 1996.
- TAKAYANAGUI, O.M.; ODASHIMA, N.S. Clinical aspects of neurocysticercosis. **Parasitology International**, Amsterdam, v.55, S.111-115, 2006.

- THEIS, J.H.; CLEARY, M.; SYVANEN, M.; GILSON, A.; SWIFT, P.; BANKS, J.; JOHNSON, E. DNA-confirmed *Taenia solium* cysticercosis in black bears (*Ursus americanus*) from California. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.55, n.4, p.456-458, 1996.
- TAY, J. Estudio del *Cysticercus cellulosae* al microscopio eletrônico. I-membrana, cuello y escolex. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v.14, p.107, 1972
- TORRES, J.R.; ISTURIZ, R. The 10 most common questions about central nervous system cysticercosis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, Philadelphia, v.5, n.8, p.482-485, 1997.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J.; Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.
- TRINDADE, M.B.; LOPES, J.L.S.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; MOREIRA, R.A.; OLIVA, M.L.V.; BELTRAMINI, L.M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1764, n.1, p.146-152, 2006.
- TSANG, V.C.W.; BRAND, J.A.; BOYER, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.159, n.1, p.50-59, 1989.
- VALADARES, M.D.M. Complexo teníase-cisticercose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.6, n.2, p.452-456, 1997.
- VANDENBOS, F.; BOSCAGLI-MELAINÉ, A.; ROTH, S.; MONDAIN-MITON, V.; PAQUIS, P.; GARI-TOUSSAINT, M.; SAINT-PAUL, M.C.; MONTAGNE, N. Neurocisticercose de diagnostic tardif: à propos de deux cas. **La Revue de Médecine Interne**, Paris, v.23, n.4, p.386-389, 2002.
- VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. **Essentials of glycobiology**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. p.85-114.
- VAZ, A.J.; LIVRAMENTO, J.A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. (Eds.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 20, p.177-184.
- VAZ, A.J.; FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E.; NAKAMURA, P.M.; CAMARGO, E.D. DOT-ELISA for detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in human cerebrospinal fluid using a new solid-phase (resin-treated polyester fabrics). Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.32, n.5, p.355-359, 1990.
- VELASCO, T.R.; ZANELLO, P.A.; DALMAGRO, C.; ARAUJO JR, D.; SANTOS, A.C.; BIANCHIN, M.M.; ALEXANDRE, V.; WALZ, R.; ASSIRATI JR, J.A.; TAKAYANAGUI, O.M. Calcified cysticercotic lesions and intractable epilepsy: a cross sectional study of 512 patients. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, London, v.77, n. 4, p. 485-488, 2006.
- VIANNA, L.G.; MACEDO, V.; COSTA, J.M. Cisticercose músculo-cutânea e visceral - Doença rara? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.33, n.2, p.129-136, 1991.

- VIANNA, L.G.; MACEDO, V.; COSTA, J.M.; MELLO, P.; SOUZA, D. Estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em Brasília, D.F. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.19, n.3, p.149-156, 1986.
- VILLOTA, G.E.; GOMEZ, D.I.; VOLCY, M.; FRANCO, A.F.; CARDONA, E.A.; ISAZA, R.; SAMZÓN, F.; TEALE, J.M.; RESTREPO, B.I. Similar diagnostic performance for neurocysticercosis of three glycoprotein preparations from *Taenia solium* metacestodes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.68, n.3, p.276-280, 2003.
- WALTS, A.E.; NIVATPUMIN, T.; EPSTEIN, A. Pulmonary cysticercus. **Modern Pathology**, Baltimore, v.8, n.3, p.299-302, 1995.
- WANG, I.C.; GUO, J.X.; MA, Y.X.; CHUNG, W.C.; LU, S.C.; FAN, P.C. Sexual development of *Taenia solium* in hamsters from rodent-derived cysticerci. **Journal of Helminthology**, London, v.73, n.4, p.347-350, 1999.
- WEINBERG, M. Recherche des anticorps spécifiques dans la distomatose et la cisticercose. **C. S. Soc. Ed.**, Paris, v.66, p.219, 1909.
- WHITE, A.C. Jr. Neurocysticercosis: Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v.51, p.187-206, 2000.
- WILSON, M.; BRYAN, R.T.; FRIED, J.A.; WARE, D.A.; SCHANTZ, P.M.; PILCHER, J.B.; TSANG, V.C.W. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.64, n.5, p.1007-1009, 1991.
- WU, A.; WU, J.H.; LIN, L.; LIN, S.; LIU, J. Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (Jacalin). **Life Sciences**, Oxford, v.72, n.20, p.2285-2302, 2003.
- YANCEY, L.S.; DIAZ-MARCHAN, P.; WHITE, A.C. Cysticercosis: recent advances in diagnosis and management of neurocysticercosis. **Current Infectious Disease Reports**, Philadelphia, v.7, n.1, p.39-47, 2005.
- YU, L.; HUANG, M.; WANG, P.G.; ZENG, X. Cross-linked surface-grafted glycopolymer for multivalent recognition of lectin. **Analytical Chemistry**, Washington, v.79, n.23, p.8979-8986, 2007.
- ZENG, Y.; CAI, X.; LUO, X.; HU, Z.; JING, Z. Characterization of a new gene (SLC10) with a spliced leader from *Taenia solium*. **The Veterinary Journal**, London, v.175, n.1, p.96-101, 2008.
- ZINI, D.; FARREL, V.J.R.; WADEE, A.A. The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, London, v.53, n.8, p.656-661, 1990.
- ZOLI, A.; SHEY-NJILA, O.; ASSANA, E.; NGUEKAM, J.P.; DORNY, P.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in Western and Central Africa. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.35-42, 2003.

ANEXO 1

Artigo Científico referente à Tese publicado em periódico internacional (TM&IH - fator de impacto: 2.595)

Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis

Gleyce Alves Machado, Fernanda Maria Santiago, José Roberto Mineo and Julia Maria Costa-Cruz

Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

Summary

OBJECTIVE To evaluate the detergent and aqueous phases of crude saline extract (crude) of *Taenia solium* metacestodes extracted with Triton X-114, for the detection of immunoglobulin G (IgG) antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblot for the laboratory diagnosis of human neurocysticercosis.

METHOD Serum samples were collected from 138 individuals and tested; 40 were diagnosed with neurocysticercosis (NC; group 1), 58 presented other parasitic diseases (group 2) and 40 were apparently healthy (group 3).

RESULTS The detergent phase showed only one dominant component (70–50 kDa), while the aqueous phase showed four (116, 110, 97 and 77 kDa) by silver staining. ELISA sensitivity and specificity were 92.5% and 84.5% for crude phase, 92.5% and 93.3% for detergent phase and 72.5% and 72.6% for aqueous phase.

CONCLUSIONS The immunoblot of the antigens confirmed the results obtained by ELISA. Detergent phase purified from *T. solium* metacestodes was an important source of specific peptides and was efficient in detecting *T. solium* metacestodes antibodies in serum samples. This phase can be used for detecting IgG antibodies to *T. solium* metacestodes in seroepidemiological investigations and in the diagnostic screening of NC patients.

keywords neurocysticercosis, *Taenia solium*, ELISA, immunoblot, Triton X-114

Introduction

Neurocysticercosis (NC) is a faecal-borne infection caused by ingestion of *Taenia solium* eggs and the most common helminth infection of the human central nervous system. Metacestodes usually affect the central nervous system and can be confused with other brain pathologies presenting similar clinical and radiological findings (White 2000; Pawlowski *et al.* 2005). The major clinical manifestations of NC are seizures, intracranial hypertension, focal neurological deficits and sequelae such as epilepsy, hydrocephalus and dementia. NC occurs worldwide but is more frequent in Latin America, Africa and India (Carpio 2002; Fleury *et al.* 2006; Wandra *et al.* 2006).

The diagnosis of NC is based on clinical, epidemiological and laboratorial findings, as well as on imaging techniques such as axial computed tomography and magnetic resonance. The imaging techniques are efficient methods for the visualization of cysticerci and of inflammatory response, but are very expensive and inaccessible to most of the

affected population (Takayanagui & Odashima 2006). The serological diagnosis of NC is very important in routine clinical management of patients because it supports the diagnosis for patients whose clinical and radiological profiles are compatible with this disease (White 2000). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblot are the two most useful tests to detect antibodies to *T. solium* antigens in serum or cerebrospinal fluid (CSF; Hawk *et al.* 2005; Dua & Aneja 2006).

ELISA using different antigenic extracts from *T. solium* metacestodes, such as crude saline extract, vesicle fluid, crude alkaline extract, scolex or membrane extracts, for NC diagnosis has shown differences in test sensitivity and specificity (Costa *et al.* 1982; Shiguekawa *et al.* 2000; Ishida *et al.* 2006). Immunoblot has been used for the study of NC, and different indices of sensitivity and specificity have been observed, depending on the antigen preparation used (Simac *et al.* 1995; Barcelos *et al.* 2001; Proaño-Narvaez *et al.* 2002; Ikejima *et al.* 2005; Ishida *et al.* 2006). Although the immunological tests used for the

diagnosis of cysticercosis have been considerably refined, the choice of an adequate antigen is required to improve diagnostic efficiency, and this continues to be a subject of interest (Pardini *et al.* 2002).

A solution of Triton X-114 (TX-114) non-ionic surfactant is homogeneous at 0 °C but separates into detergent phase (D) and aqueous (A) phase above 20 °C. The efficiency of separation increases with temperature and it is sensitive to the presence of other surfactants. Integral membrane proteins of an amphiphilic nature are recovered in D phase and hydrophilic proteins are found exclusively in A phase (Bordier 1981). The purpose of this study was to evaluate the D and A phases extracted with TX-114 from crude saline extract (crude) of *T. solium* metacestodes, for the detection of immunoglobulin G (IgG) antibodies by ELISA and immunoblot in the laboratory diagnosis of human NC.

Methods

Patients and serum samples

Serum samples were collected from 138 subjects from the Laboratory of Clinical Analysis at the Clinical Hospital (groups 1 and 2) and from the Laboratory of Parasitology (group 3) of the Federal University of Uberlândia in the state of Minas Gerais, Brazil. Group 1 was constituted by 40 patients that had been diagnosed with definitive NC, based on the presence of clinical syndrome, epidemiological data, positive immunological test and evidence of the parasite by computerized tomography, according to Del Brutto *et al.* (1996), as follows.

- All patients presented at least one type of clinical manifestation suggestive of NC such as: epilepsy (55%), cephalgia (50%), dizziness (27.5%), dementia (12.5%), faintness (10%), hydrocephalus (2.5%) and no signs or symptoms of cysticercosis in other organs.
- All patients came from or lived in an area where cysticercosis is endemic; and at least two patients had household contact with *T. solium* infection.
- All patients tested positive in the CSF ELISA for the detection of IgG anticysticercal antibodies.
- They presented evidence of parasite neuroimaging, with these characteristics: 8 (20%) vesicular; 15 (37.5%) vesicular/calcified; 17 (42.5%) calcified metacestodes (classified according to Sotelo *et al.* 1985).

Group 1 patients suffered from pure NC, as no signs or symptoms of cysticercosis were found in other organs.

Group 2 consisted of 58 patients who had other parasitoses: *Ascaris lumbricoides* (6), *Echinococcus granulosus* (10), *Enterobius vermicularis* (6), hookworm (6), *Hymenolepis nana* (4), *Schistosoma mansoni* (10), *Strongyloides stercoralis* (4), *Taenia* sp. (10) and *Trichuris trichiura* (2). Group 3 consisted of 40 apparently healthy volunteers, based on their clinical picture. Although they came from an area endemic for cysticercosis, none had a household contact with *T. solium* infection or previous history of taeniasis or cysticercosis. Group 3 individuals also underwent three faecal sample tests (Baermann 1917; Lutz 1919) which were negative.

This study was approved by the Federal University of Uberlândia Ethical Committee.

Parasites and antigens

Fresh *T. solium* metacestodes were collected from massively infected pig muscle and were carefully dissected from the host tissues, washed repeatedly and stored at -20 °C. Crude extract was prepared as described by Costa *et al.* (1982). The D and A phases were obtained as described by Bordier (1981) using solution of TX-114 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), starting from 4 mg of total mass of crude extract. A flowchart summarizing the steps of the protein partitioning procedure is shown in Figure 1. The protein of each antigen preparation was determined according to Lowry *et al.* (1951).

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. Antigens were diluted (v/v) in sample buffer, and after boiling at 98 °C for 3 min, all antigen preparations and molecular weight markers (Sigma) were submitted to electrophoresis in sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) at 12% under non-reducing conditions (Laemmli 1970). Antigen bands and molecular weight markers were visualized by silver staining (Friedman 1982), and relative molecular masses estimated using a logarithmic plot of the migration of a set of molecular weight standards included in each gel.

ELISA was carried out according to Shiguekawa *et al.* (2000), with modifications. Briefly, polystyrene microplates (Interlab, Brazil) were coated with crude extract, D or A phase antigen preparations at concentrations of 10 µg/ml in 0.06 M carbonate bicarbonate buffer, pH 9.6. These preparations were incubated overnight at 4 °C in a final volume of 50 µl per well. Microplates were washed thrice, 5 min each time with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and the serum samples diluted 1:200 in PBS-T were added and incubated for 45 min at 37 °C. After washing, enzyme conjugate

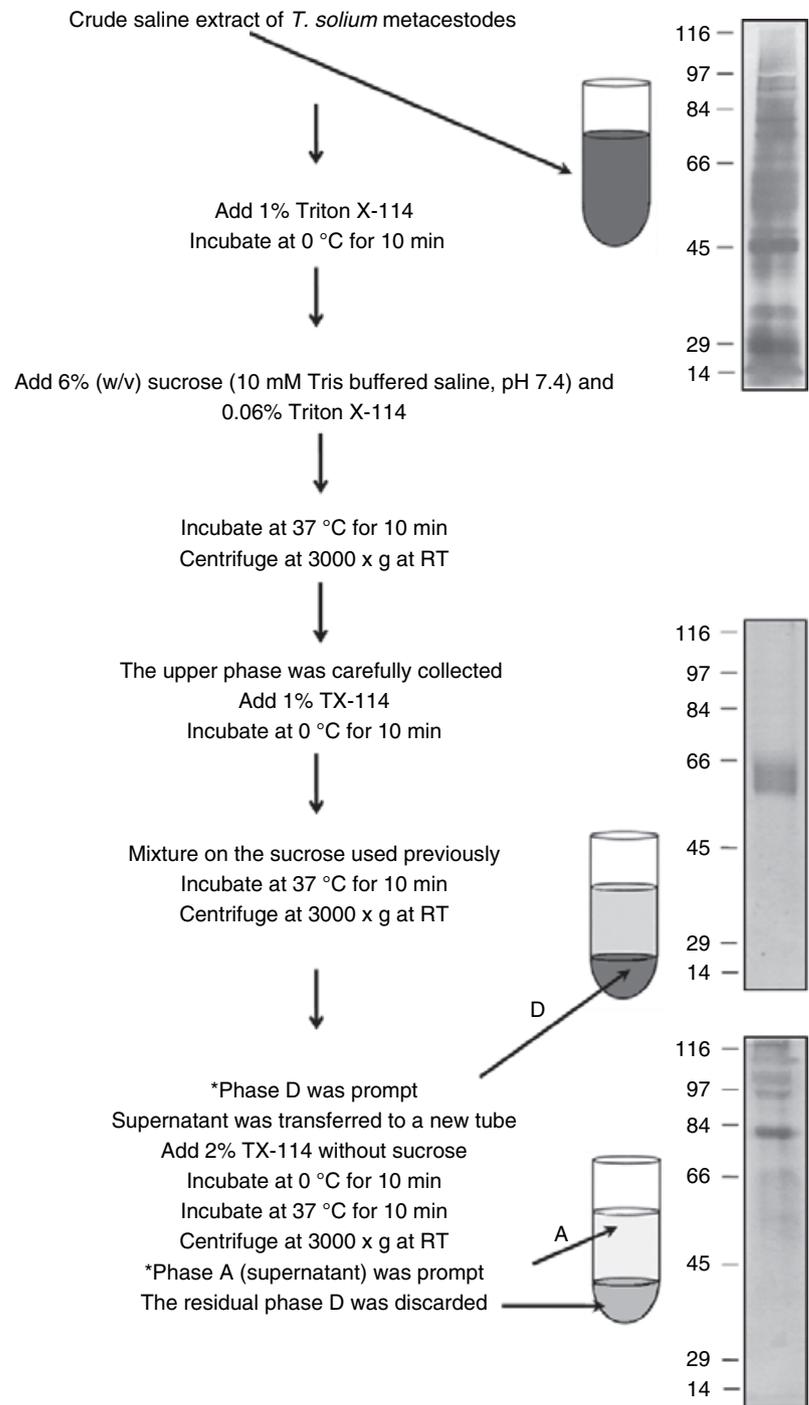


Figure 1 Flowchart for the protein partitioning procedure of saline crude extract of *Taenia solium* metacestodes and electrophoretic profile of saline crude extract, detergent phase (D) and aqueous phase (A) in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis at 12% by silver staining. *Purified proteins were precipitated (1:2; v/v) in acetone at 4 °C. RT, room temperature. Molecular mass standards are given on the left in kilodaltons.

(peroxidase-goat anti-human IgG, Fc specific; Sigma) was added in a dilution of 1:1000 in PBS-T for all antigens and incubated for 45 min at 37 °C. The assay was developed after the washing procedure by adding the enzymatic

substrate consisting of hydrogen peroxide and ortho-phenylenediamine (OPD) in 0.1 M citrate phosphate Na_2HPO_4 buffer pH 5.5 for 15 min followed by 25 μl per well of H_2SO_4 (2 N) to stop the reaction. Optical densities

(OD) were determined at 492 nm in an ELISA reader (Titertek Plus, Flow Laboratories, USA). Cut-off values were established using the mean OD of three non-reactive serum samples plus two standard deviations, as described by Bassi *et al.* (1991). The reactivity index (RI) was calculated according to Pardini *et al.* (2002). All samples showing RI > 1 were considered positive.

The immunoblot assay was performed according to Shiguekawa *et al.* (2000), with modifications. Antigen preparations were subjected to electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (0.45 µm; Sigma), as described by Towbin *et al.* (1979), by using a transfer apparatus (Multiphor II, Pharmacia-LKB, USA). Nitrocellulose strips containing antigen preparations were blocked with 5% non-fat milk in PBS-T (PBS-TM) for 2 h at room temperature and incubated overnight with serum samples diluted at 1:50 in PBS-TM 1% at 4 °C. After six washes with PBS-TM 1%, the strips were incubated for 2 h at room temperature with peroxidase-labelled goat IgG anti-human IgG conjugate, whole molecule (Sigma), diluted 1:1500 in PBS-TM 1%. The strips were washed in PBS and developed for 3 min in substrate solution containing hydrogen peroxide and 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma) in PBS. The reaction was stopped by washing with distilled water and positive reactions were determined by the appearance of clearly defined bands. The relative molecular masses of the recognized bands were determined by comparison with molecular markers (Sigma), and the serum samples were

considered positive when immunodominant proteins of 70–50 kDa were recognized.

Data analysis

The geometric means (gm) of RI were calculated for each group and extract. The chi-square test was used to determine the significance of differences between the analysed extracts and between the groups for each extract. Probability (*P*) values of <0.05 were regarded as significant. We calculated the sensitivity, specificity and diagnostic efficiency (DE) (Barbieri *et al.* 1998) and the Youden Index (YI) (Youden 1950).

Results

Evaluation of the D and A phases extracted with Triton X-114 from crude extract of *Taenia solium* metacestodes

The crude saline extract was purified using only TX-114. The protein yield during this process was 25% and 37.5% for D and A phases, respectively. Only one band with a molecular weight of approximately 70–50 kDa was visible in the D phase, while the A phase showed four predominant components with apparent molecular sizes of 116, 110, 97 and 77 kDa, respectively (Figure 1). Proteins between the migration at 70–50 kDa, observed only in the D phase, were recognized by the serum samples of positive cysticercosis (Figure 2).

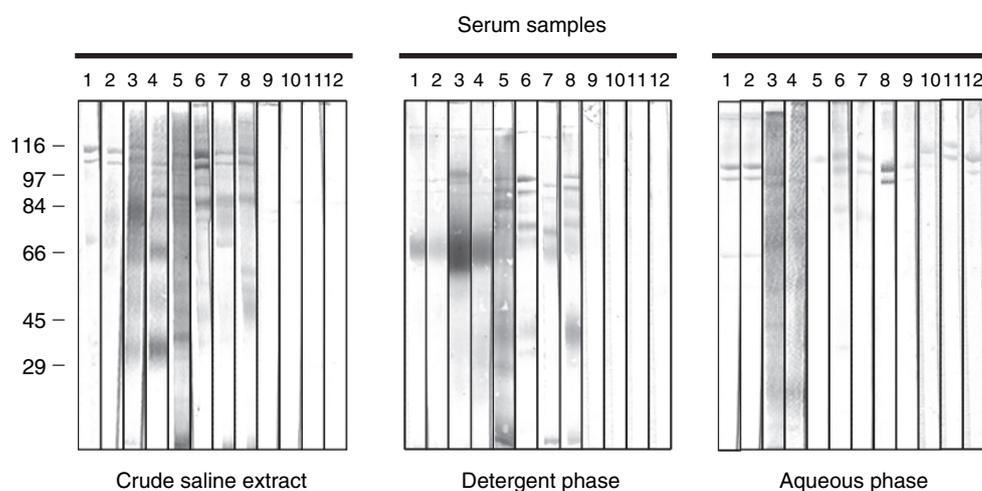


Figure 2 Representative immunoblot of sera from patients with a definitive diagnosis of neurocysticercosis (NC) (group 1; lanes 1–4), *Echinococcus granulosus* (group 2; lanes 5–8) and apparently healthy individuals (group 3; lanes 9–12) using crude saline extract, detergent and aqueous phases from *Taenia solium* metacestodes. Molecular mass standards are given on the left in kilodaltons.

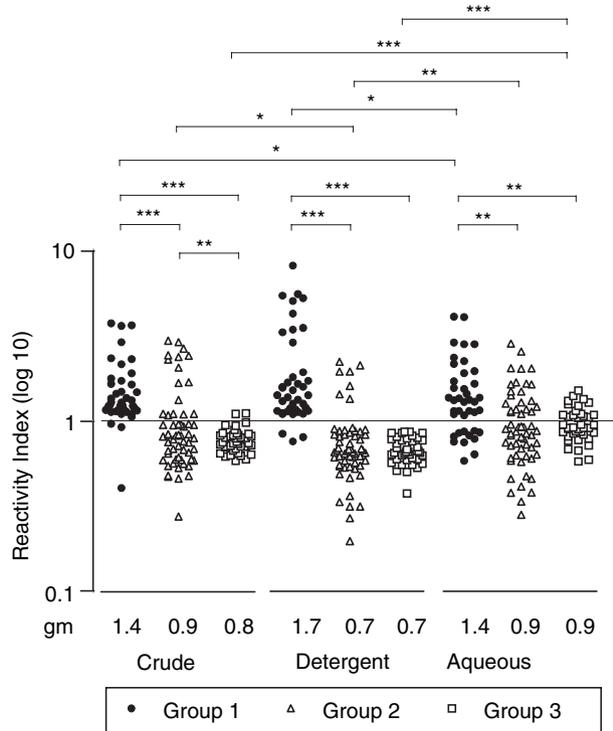


Figure 3 Detection of immunoglobulin G antibodies anti-*Taenia solium* metacystodes in serum samples from patients with a definitive diagnosis of neurocysticercosis (NC) (group 1; $n = 40$), other parasitoses (group 2; $n = 58$) and apparently healthy individuals (group 3; $n = 40$) by enzyme-linked immunosorbent assay using the crude saline extract (crude), detergent phase (D phase) and aqueous phase (A phase) from *Taenia solium* metacystodes. The horizontal bar indicates the cut-off (reactivity index = 1). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$.

Sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot for detection of immunoglobulin G antibodies

As demonstrated in Figure 3, all samples were tested by ELISA by using three antigen preparations. Exactly 92.5% of serum samples from group 1 were positive for both crude and D phase antigens, whereas 72.5% were positive for A phase antigen. In group 2, 27.6% and 37.9% of the serum samples were positive for crude extract and A phase antigen, respectively; but only 12.1% of the serum samples of group 2 tested positive for D phase antigen. As shown in Table 1, cross-reactivity in ELISA for group 2 of the serum samples was predominantly because of *E. granulosus* infection. All serum samples from group 3 were negative when using D phase antigen, but 5% tested positive for crude extract and 40% for A phase antigen (Figure 3). Therefore, considering groups 2 and 3

Table 1 Reactivity of sera from patients with other parasitoses (group 2, $n = 58$) by ELISA for detection of immunoglobulin G (IgG) to crude saline extract (crude), detergent phase (D) and aqueous phase (A) from *Taenia solium* metacystodes

Infection	Antibody detection		
	Crude	D	A
<i>Ascaris lumbricoides</i> ($n = 6$)	2 (33.3)	0 (0)	1 (16.7)
<i>Echinococcus granulosus</i> ($n = 10$)	10 (100)	7 (70)	10 (100)
<i>Enterobius vermicularis</i> ($n = 6$)	0 (0)	0 (0)	2 (33.3)
<i>Hymenolepis nana</i> ($n = 4$)	0 (0)	0 (0)	2 (50)
Hookworm ($n = 6$)	0 (0)	0 (0)	3 (50)
<i>Schistosoma mansoni</i> ($n = 10$)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Strongyloides stercoralis</i> ($n = 4$)	1 (25)	0 (0)	2 (50)
<i>Taenia</i> sp. ($n = 10$)	3 (30)	0 (0)	2 (20)
<i>Trichuris trichiura</i> ($n = 2$)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

n , samples number; $n+$, positives samples; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

of serum samples, ELISA specificity was 84.5% for crude extract, 93.3% for D phase antigen and 72.6% for A phase antigen. These data resulted in YI values of 0.77 for crude extract, 0.86 for D phase and 0.50 for A phase antigen. Diagnostic efficiency was 86.8% for crude extract, 93.2% for D phase and 73.8% for A phase antigen.

Immunoblot assay, which was performed in all ELISA-reactive serum samples, revealed a wide range of molecular markers varying from 116 to 13 kDa when using crude extract (Figure 4). However, when using D phase antigen, all patients diagnosed with definitive NC reacted strongly with the 70–50-kDa components (Figure 4a). Patients with *E. granulosus* infection showed no reactivity with the 70–50-kDa components, although various reactive components (94, 87, 64, 51, 30 and 24 kDa) were present (Figure 4b). All groups of serum samples showed poor reactivity to A phase antigen, mainly located in high molecular components (Figure 4).

Discussion

This procedure we described is fast and relatively easy to perform, and does not require specialized apparatus or ultracentrifugation steps (Bricker *et al.* 2001). The major advantages of using antigens purified by TX-114 solution are minimal cost for production in the laboratory, simple and easy extraction, high efficiency, speed and lower toxicity to the environment than extractions involving organic solvents (Manzoori & Bavili-Tabrizi 2002). Good results have been obtained using fraction D, as described by Chaturvedi and Gupta (2002), where the performance of integral membrane antigens of *Mycobacterium habana*

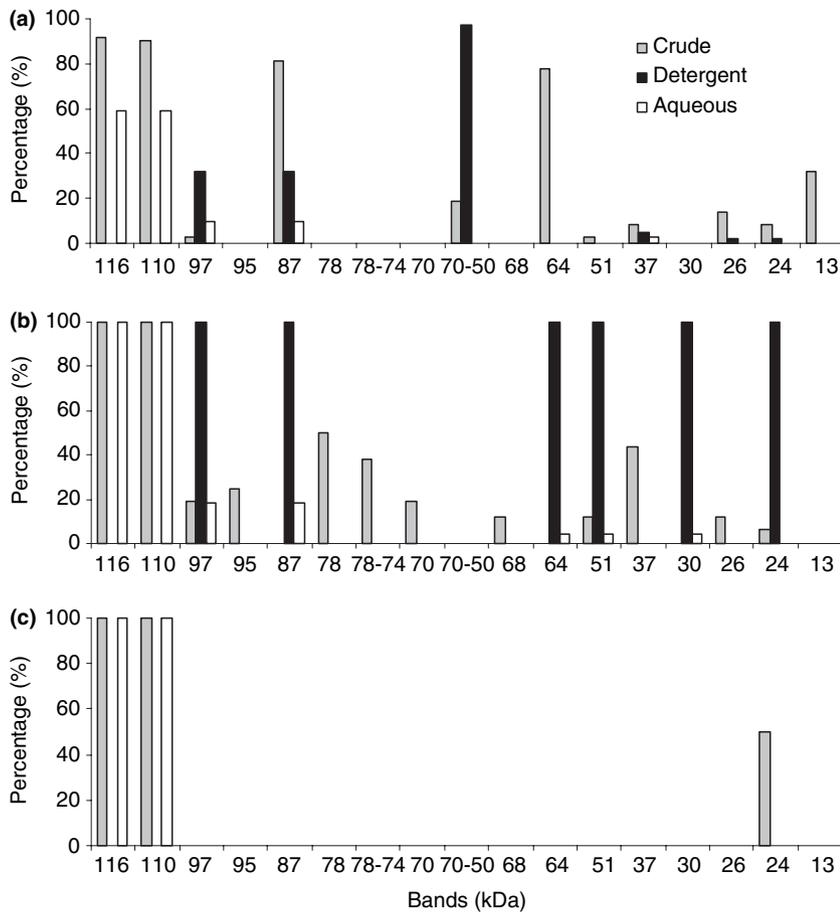


Figure 4 Percentage of reactivity frequency of serum samples enzyme-linked immunosorbent assay-reactive by immunoblot using the crude saline extract, detergent and aqueous phases from *Taenia solium* metacestodes. a – group 1: patients with definitively diagnosed neurocysticercosis (NC); b – group 2: patients with other parasitoses; and c – group 3: apparently healthy individuals.

recovered from the fraction D during TX-114 treatment showed promising non-tubercular candidate antigens in ELISA-based serodiagnosis of extrapulmonary tuberculosis with substantial sensitivity, specificity and safety.

We studied the extraction by TX-114 of crude extract from *T. solium* metacestodes in the diagnosis of human NC, where the fraction D obtained proved more specific than other extracts. None of the samples from healthy individuals were reactive and only seven serum samples from patients with *E. granulosus* were reactive (Table 1), indicating excellent diagnostic efficiency and significant YI and DE. The group with other parasitoses is representative of the general population, particularly in developing countries where parasitic diseases are highly prevalent. Therefore, cross-reactions may occur in screening tests such as ELISA, whose results require later confirmation using more specific antigens such as purified antigens. For practical purposes, cross-reactions between cysticercosis and hydatidosis, which have quite different clinical and epidemiological characteristics, are irrelevant (Ishida *et al.* 2003). Dekumyoy *et al.* (2000) using cystic fluid antigen of

T. solium metacestodes, and Dekumyoy *et al.* (2004), using delipidized antigen of *T. solium* metacestodes, obtained similar cross-reactivity rates, especially in samples from patients with cystic echinococcosis.

The fact that the immunoblot assay for patients with NC and *E. granulosus* using crude antigen showed many bands made it difficult to discriminate between these patients, but this problem did not occur with the D phase antigen. Although seven samples of *E. granulosus* tested positive in ELISA with D phase, they were considered negative in the immunoblot assay because of differences in the band profiles, which allowed for discrimination between these patients. The band with 70–50 kDa is an important protein for the diagnosis of NC patients, as proteins with 50 kDa show high levels of sensitivity and specificity (Hancock *et al.* 2004; Bueno *et al.* 2005).

D phase showed 92.5% sensitivity and 93.3% specificity, which was similar to the values reported by authors who used other techniques of antigen purification for NC diagnosis (Pardini *et al.* 2002; Peralta *et al.* 2002; Hancock *et al.* 2006). Moreover, D phase provided results superior

G. A. Machado *et al.* **Assessing *T. solium***

to those obtained by other authors using whole extracts, where sensitivity ranged from 70% to 85% and specificity from 80% to 88% (Shigekawa *et al.* 2000; Bueno *et al.* 2000a,b) for the detection of IgG anti-*T. solium* metacystodes by ELISA. Although crude extracts have been widely used for primary screening in endemic areas, identification and purification of highly specific glycoproteins of *T. solium* metacystodes have been the main focus for serodiagnosis in NC (Ito 2002).

Although our study was conducted with well-documented samples from NC patients or from patients with heterologous infections or apparently healthy individuals, previous studies using whole metacystode extracts have demonstrated that either ELISA or immunoblot are useful tools for epidemiological screening of NC (Silveira-Lacerda *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 2006; Prestes-Carneiro *et al.* 2006). Considering the immunoassay design described herein and the advantages when using hydrophobic fraction as antigenic substrate, it can be assumed that this assay can also be efficiently used to identify individuals with residual antibodies as expression of the presence of calcified metacystodes, as frequently found in endemic areas.

The results obtained here by ELISA confirm that antigenic fractions purified from *T. solium* metacystodes by TX-114, especially D phase, are important sources of specific peptides and are efficient in the diagnosis of NC. The utilization of D phase antigen components may contribute to seroepidemiologic studies to evaluate the situation of taeniasis-cysticercosis in several countries.

Acknowledgements

This work was supported by grant from the Brazilian research support agency CAPES, a fellowship to Gleyce Alves Machado, and by the Federal University of Uberlândia (UFU), Brazil. The authors thank Dr Leandro P. de Moura from the Department of Neurology, UFU, Brazil, for his help in the selection of patients.

References

- Baermann G (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. mit H. Geneesk. *Batavia, Laboratories Weltevreden Feestbundel*, 41–47.
- Barbieri M, Fernández V, González G, Luaces VM & Nieto A (1998) Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunology* **20**, 51–61.
- Barcelos ISC, Mineo JR, Silva DAO *et al.* (2001) Detection of IgG in cerebrospinal fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacystodes by ELISA and immunoblot assay. *Tropical Medicine and International Health* **6**, 219–226.
- Bassi GE, Ishiki DK, Ferreira AW & Camargo ME (1991) A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano – considerações sobre o limiar de reatividade. *Revista Brasileira de Patologia Clínica* **27**, 49–52.
- Bordier C (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 1604–1607.
- Bricker TM, Prevost M, Vu V, Laborde S, Womack J & Frankel LK (2001) Isolation of luminal proteins from spinach thylakoid membranes by Triton X-114 phase partitioning. *Biochimica et Biophysica Acta* **1503**, 350–356.
- Bueno EC, Vaz AJ, Machado LR, Livramento JA & Mielle SR (2000a) Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 146–151.
- Bueno EC, Vaz AJ, Machado LR & Livramento JA (2000b) Detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. *Arquivos de Neuropsiquiatria* **58**, 18–24.
- Bueno EC, Scheel CM, Vaz AJ *et al.* (2005) Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **72**, 278–283.
- Carpio A (2002) Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infectious Diseases* **2**, 751–762.
- Chaturvedi V & Gupta HP (2002) Evaluation of integral membrane antigens of *Mycobacterium habana* for serodiagnosis of extrapulmonary tuberculosis: association between levels of antibodies and *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **33**, 1–7.
- Costa JM, Ferreira AW, Makino MM & Camargo ME (1982) Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **24**, 337–341.
- Dekumyoy P, Anantaphruti MT, Nuamtanong S, Watthanakulpnich D, Waikagu J & Danis M (2000) Neurocysticercosis: utilizing the cystic fluid antigen from *Taenia solium* metacystodes for diagnosis by IgG-ELISA. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **31**(Suppl), 21–25.
- Dekumyoy P, Waikagul J, Vanijanonta S *et al.* (2004) Cysticercosis: IgG-ELISA evaluations of peak1 antigen and <30 kDa antigen of delipidized extract of *Taenia solium* metacystodes. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **35**, 1–9.
- Del Brutto OH, Wadia NH, Dumas M, Cruz M, Tsang VCW & Schantz PM (1996) Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. *Journal of the Neurological Sciences* **142**, 1–6.
- Dua T & Aneja S (2006) Neurocysticercosis: management issues. *Indian Pediatrics* **43**, 227–235.
- Fleury A, Morales J, Bobes RJ *et al.* (2006) An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **100**, 551–558.

G. A. Machado *et al.* **Assessing *T. solium***

- Friedman RD (1982) Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline poly-acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **126**, 346–349.
- Hancock K, Patabhi S, Greene RM *et al.* (2004) Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* **133**, 115–124.
- Hancock K, Patabhi S & Whitfield FW (2006) Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* **147**, 109–117.
- Hawk MW, Shahlaie K, Kim KD & Theis JH (2005) Neurocysticercosis: a review. *Surgical Neurology* **63**, 123–132.
- Ikejima T, Piao ZX, Sako Y *et al.* (2005) Evaluation of clinical and serological data from *Taenia solium* cysticercosis patients in eastern Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **99**, 625–630.
- Ishida MMI, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, Hoshino-Shimizu S & Vaz AJ (2003) Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Tropica* **89**, 73–84.
- Ishida MMI, Peralta RHS, Livramento JA, Hoshino-Shimizu S, Peralta JM & Vaz AJ (2006) Serodiagnosis of neurocysticercosis in patients with epileptic seizure using ELISA and immunoblot assay. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **48**, 343–346.
- Ito A (2002) Serologic and molecular diagnosis of zoonotic larval cestode infections. *Parasitology International* **51**, 221–235.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265–275.
- Lutz AV (1919) *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **11**, 121–125.
- Manzoori JL & Bavili-Tabrizi A (2002) Cloud point preconcentration and flame atomic absorption spectrometric determination of Cd and Pb in human hair. *Analytica Chimica Acta* **470**, 215–221.
- Oliveira HB, Rodrigues RM, Barcelos ISC, Silva LP & Costa-Cruz JM (2006) Anti-*Taenia solium* metacestode IgG antibodies in serum samples from inhabitants of a central-western region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **48**, 49–52.
- Pardini AX, Peralta RH, Vaz AJ, Machado LR & Peralta JM (2002) Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9**, 190–193.
- Pawlowski Z, Allan J & Sarti E (2005) Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. *International Journal for Parasitology* **35**, 1221–1232.
- Peralta RHS, Vaz AJ, Pardini A *et al.* (2002) Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Acta Tropica* **83**, 159–168.
- Prestes-Carneiro LE, Freitas SBZ, Zago SCS *et al.* (2006) Taeniosis-cysticercosis complex in individuals of a peasants' settlement (Teodoro Sampaio, Pontal of Paranapanema, SP, Brazil). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **101**, 15–20.
- Proaño-Narvaez JV, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, García-Jerónimo RC & Correa D (2002) Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 2115–2118.
- Shigekawa KYM, Mineo JR, Moura LP & Costa-Cruz JM (2000) ELISA and western blotting tests in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. *Tropical Medicine and International Health* **5**, 443–449.
- Silveira-Lacerda EP, Machado ER, Arantes SCF & Costa-Cruz JM (2002) Anti-*Taenia solium* metacestodes antibodies in serum from blood donors from four cities of Triângulo Mineiro area, Minas Gerais, Brazil, 1995. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **44**, 229–231.
- Simac C, Michel P, Andriantsimahavandy A, Esterre P & Michault A (1995) Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis. *Parasitology Research* **81**, 132–136.
- Sotelo J, Guerrero V & Rubio F (1985) Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Archives of Internal Medicine* **145**, 442–445.
- Takayanagui OM & Odashima NS (2006) Clinical aspects of neurocysticercosis. *Parasitology International* **55**(Suppl), S111–S115.
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350–4354.
- Wandra T, Sutisna P, Dharmawan NS *et al.* (2006) High prevalence of *Taenia saginata* taeniasis and status of *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia, 2002–2004. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **100**, 346–353.
- White AC Jr (2000) Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annual Review of Medicine* **51**, 187–206.
- Youden WJ (1950) Index for rating diagnosis tests. *Cancer* **3**, 32–35.

Corresponding Author Julia Maria Costa-Cruz, Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará 1720, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil. Tel.: +55 34 3218 2187; Fax: +55 34 3218 2332; E-mail: costacruz@ufu.br