

LILIAN LAMECK MONTEIRO

EMPREGO DE ANTÍGENOS DE LARVAS DE *Taenia crassiceps* E *Taenia solium* EM
TESTE ELISA PARA DIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2004

LILIAN LAMECK MONTEIRO

**ANTÍGENOS DE LARVAS DE *Taenia crassiceps* E *Taenia solium* EM
TESTE ELISA PARA DIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 14 de dezembro de 2004.

Prof. Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo
(Conselheiro)

Profa. Paula Dias Bevilacqua
(Conselheira)

Prof. Jackson Victor de Araújo

Prof. Wagner Luiz Moreira dos Santos

Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, Autor da vida e fonte de toda a minha inspiração, em quem todas as coisas se tornam possíveis. Aos meus pais, por toda paciência, apoio e amor dispensados a mim, sobretudo pelo exemplo de lutar e nunca desanimar perante os obstáculos. À minha avó, pelas orações e pelo exemplo de fé e confiança nas situações difíceis e ao meu irmão, pela amizade e ajuda nas “questões técnicas”. Ao meu noivo, por todo apoio técnico, auxílio, consolo, amor e por ser tão especial em minha vida.

Ao meu orientador, professor Paulo Sérgio de Arruda Pinto, pelas oportunidades, orientações, atenção e, sobretudo, por ter confiado e acreditado em mim; aos meus conselheiros, professora Paula Dias Bevilacqüia pela atenção, sugestões e auxílio, e professor Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo por ter cedido o laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários, bem como material de trabalho, quando houve necessidade dos mesmos, assim como pelos esclarecimentos e sugestões. Ao professor Eduardo Paulino da Costa, cuja orientação nas análises estatísticas foi extremamente valiosa. Ao professor Jackson Victor de Araújo, que através de seu orientado Arthur Kanadani, nos cedeu um dos materiais essenciais à condução de todo o trabalho; ao CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos da Secretaria de Saúde do Paraná), na pessoa do Dr. João Carlos Minozzo, por ter cedido soros de animais infectados experimentalmente, à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, na pessoa do Dr. Antônio Augusto Mendes Maia, pelos soros e demais materiais cedidos, bem como à Escola de Veterinária da UFMG, na pessoa do professor Wagner Luiz Moreira dos Santos, pelos soros doados; aos funcionários do setor de Medicina Veterinária Preventiva, particularmente Luís Carlos, Dagoberto e Marquinhos por toda disposição e ajuda; ao “Cauzinho” pela disponibilidade e boa vontade em ajudar sempre que era preciso; ao funcionário do LBCH Márcio Mendes, à Rosi, por seu exemplo de competência e organização, bem como por toda paciência para com todos os que precisam de seu trabalho; à Maria Alice, por todo auxílio, companhia e amizade durante o período em que convivemos no laboratório, Fernanda e Francesca pela ajuda sempre muito bem-vinda; ao Departamento de Veterinária e à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade, à FAPEMIG pelo financiamento do projeto e à CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos meus irmãos de fé (Eunice, Wânia, Geórgia, Érica, Carlos, Rozane, Mazinho, Dani, Diana, Francisco, Franciane, Deire e Pr. Marlos) e aos meninos do Clube Santo, enfim todos os membros e líderes que passaram pela IMV de 97 até aqui) pelas lições e

ensinamentos compartilhados durante toda a nossa convivência, aos amigos e amigas da Vet-97 (Lú, Janete, Lolô, Katita, Vanessa, Sid, André, Cris, Douglas, Márcio, Nilo, Tico) e aos colegas do mestrado (Liza, Carlos, Pri, Sandrinha, Fabi, Augusto). À Dona Rita, por ser quase uma avó para mim; à Rose, pela amizade, atenção e ajuda, em especial nessa reta final.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico da <i>Taenia saginata</i>	8
Figura 2. Representação peptídica dos antígenos total (T-cra) e vesicular (V-cra) de larva de <i>T. crassiceps</i> e total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de <i>T. solium</i> e marcador molecular (MM) Sigma M 4038 em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob gradiente 5 a 20%.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Absorvância (562 nm) e concentração protéica ($\mu\text{g/mL}$) dos antígenos total e vesicular de larva de <i>T. crassiceps</i> (T-cra) e antígenos total, de escólex e de membrana de larva de <i>T. solium</i> (T-sol) determinada através de dosagem de proteínas utilizando o método do ácido bicinconínico.....	31
Tabela 2. Caracterização dos antígenos total e vesicular de larva de <i>T. crassiceps</i> (T-cra) e total, de escólex e de membrana de larva de <i>T. solium</i> (T-sol) pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o tipo de peptídeo.....	31 e 32
Tabela 3. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno total de larva de <i>T. crassiceps</i> e diluições de soros.....	33
Tabela 4. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno total de larva de <i>T. crassiceps</i>	34
Tabela 5. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno total de larva de <i>T. crassiceps</i>	34
Tabela 6. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno total de larva de <i>T. crassiceps</i>	35
Tabela 7. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras e diluições de soros para o antígeno total de larva de <i>T. crassiceps</i>	35
Tabela 8. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno de líquido vesicular de larva de <i>T. crassiceps</i> e diluições de soros.	36
Tabela 9. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno de líquido vesicular de larva de <i>T. crassiceps</i>	37

Tabela 10. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno de líquido vesicular de larva de <i>T. crassiceps</i>	37
Tabela 11. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno de líquido vesicular de larva de <i>T. crassiceps</i>	38
Tabela 12. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras e diluições de soros para o antígeno de líquido vesicular de larva de <i>T. crassiceps</i>	39
Tabela 13. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno total de larva de <i>T. solium</i> e diluições de soros.	39
Tabela 14. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno total de larva de <i>T. solium</i>	40
Tabela 15. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno total de larva de <i>T. solium</i>	40
Tabela 16. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno total de larva de <i>T. solium</i>	41
Tabela 17. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras e diluições de soros para o antígeno total de larva de <i>T. solium</i>	41
Tabela 18. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno de escólex de larva de <i>T. solium</i> e diluições de soros.....	42
Tabela 19. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno de escólex de larva de <i>T. solium</i>	43
Tabela 20. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno de escólex de larva de <i>T. solium</i>	43
Tabela 21. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno de escólex de larva de <i>T. solium</i>	44

Tabela 22. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras para o antígeno de escólex de larva de <i>T. solium</i>	44
Tabela 23. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno de membrana de larva de <i>T. solium</i> e diluições de soros.....	45
Tabela 24. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno de membrana de larva de <i>T. solium</i>	46
Tabela 25. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno de membrana de larva de <i>T. solium</i>	46
Tabela 26. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno de membrana de larva de <i>T. solium</i>	47
Tabela 27. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras e diluições de soros para o antígeno de membrana de larva de <i>T. solium</i>	47
Tabela 28. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função dos diferentes tipos de antígeno, total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de <i>T. crassiceps</i> , total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de <i>T. solium</i> , em suas melhores condições, e diluições de soros.....	48
Tabela 29. Número de reações positivas (Pos) e negativas (Neg) para cisticercose ao teste ELISA envolvendo os diferentes grupos de soros e os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de <i>T. solium</i> e os antígenos total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de <i>T. crassiceps</i> . Ponto de corte 1.....	50
Tabela 30. Sensibilidade (%) do teste ELISA com os soros positivos de bovinos infectados experimentalmente (1), de bovinos examinados à inspeção <i>post-mortem</i> (2) e de ambos os grupos (1+2), considerando o ponto de corte 1, para os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de <i>T. solium</i> e total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de <i>T. crassiceps</i>	51
Tabela 31. Especificidade (%) do teste ELISA com todos os soros negativos (4+5) e com soros de bovinos criados em isolamento (5), considerando o ponto de corte 1, para os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de <i>T. solium</i> e total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de <i>T. crassiceps</i>	52

Tabela 32. Número de reações positivas (Pos) e negativas (Neg) para cisticercose ao teste ELISA envolvendo os diferentes grupos de soros e os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de <i>T. solium</i> e os antígenos total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de <i>T. crassiceps</i> . Ponto de corte 2.....	53
Tabela 33. Sensibilidade (%) do teste ELISA com os soros positivos de bovinos infectados experimentalmente (1), de bovinos examinados à inspeção <i>post-mortem</i> (2) e de ambos os grupos (1+2), considerando o ponto de corte 2, para os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de <i>T. solium</i> e total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de <i>T. crassiceps</i>	54
Tabela 34. Especificidade (%) do teste ELISA com todos os soros negativos (4+5) e com soros de bovinos criados em isolamento (5), considerando o ponto de corte 2, para os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de <i>T. solium</i> e total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de <i>T. crassiceps</i>	55

ÍNDICE

RESUMO	ix e x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Aspectos taxonômicos e morfológicos da <i>Taenia saginata</i>	04
2.2. Ciclo evolutivo da <i>Taenia saginata</i>	05
2.3. Epidemiologia e controle do complexo teníase-cisticercose	06
2.4. Prevalência da cisticercose bovina	09
2.5. Resposta imunológica dos bovinos à cisticercose	10
2.6. Antígenos empregados no diagnóstico da cisticercose	12
2.7. Diagnóstico imunológico da cisticercose bovina	13
2.8. Rotina de controle da cisticercose bovina	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Amostras de soros	21
3.2. Preparo dos antígenos empregados no teste ELISA	21
3.2.1. Antígenos de larva de <i>T. crassiceps</i>	22
3.2.1.1. Antígeno total de larva de <i>T. crassiceps</i>	22
3.2.1.2. Antígeno de líquido vesicular de larva de <i>T. crassiceps</i>	22
3.2.2. Antígenos de larva de <i>T. solium</i>	23
3.2.2.1. Antígeno total de larva de <i>T. solium</i>	23
3.2.2.2. Antígeno de escólex de larva de <i>T. solium</i>	23
3.2.2.3. Antígeno de membrana de larva de <i>T. solium</i>	24
3.3. Caracterização dos antígenos	24
3.3.1. Dosagem de proteínas	24
3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	24
3.4. ELISA	25
3.4.1. Técnica básica	25
3.4.2. Padronização	26
3.4.3. Determinação dos pontos de corte	27
3.4.4. Análise Estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Caracterização dos antígenos	29
4.2. Padronização: primeira etapa	32
4.2.1. Antígeno total de larva de <i>T. crassiceps</i>	32
4.2.2. Antígeno de líquido vesicular de larva de <i>T. crassiceps</i>	36
4.2.3. Antígeno total de larva de <i>T. solium</i>	39
4.2.4. Antígeno de escólex de larva de <i>T. solium</i>	42
4.2.5. Antígeno de membrana de larva de <i>T. solium</i>	45
4.2.6. Comparação simultânea do desempenho dos antígenos	48
4.3. Padronização: segunda etapa	49
5. CONCLUSÃO	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
7. APÊNDICES	67
ANEXOS	76

RESUMO

MONTEIRO, Lilian, Lameck, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2004.

Antígenos de larvas de *Taenia crassiceps* e *Taenia solium* em teste ELISA para diagnóstico da cisticercose bovina. Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Conselheiros: Paula Dias Bevilacqua e Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

A cisticercose bovina é uma zoonose que tem o ser humano como único hospedeiro definitivo. Além de sua importância para a Saúde Pública, esta parasitose acarreta prejuízos econômicos em matadouros, ao levar as carcaças acometidas a julgamento. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um teste de diagnóstico sorológico da cisticercose bovina pelo teste ELISA empregando dois antígenos de larvas de *Taenia crassiceps* e três de *Taenia solium*. Foram utilizados 20 soros de bovinos infectados experimentalmente com ovos de *T. saginata*, 60 de bovinos com infecção natural, diagnosticados em matadouros, cinco de bovinos negativos para cisticercose, criados sob isolamento, 55 de bovinos considerados negativos em matadouros e 10 de bovinos portadores de actinomicose (n=2), actinobacilose (n=1), fasciolose (n=1) diagnosticados em matadouro e de bovinos infectados experimentalmente com *Anaplasma marginale* (n=3), *Babesia sp.* (n=2) e infecção mista por *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* (n=1). Foram empregados os antígenos total e vesicular de larva de *Taenia crassiceps* e total, de escólex e de membrana de larva de *Taenia solium* no teste ELISA, após prévia caracterização em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob gradiente 5 a 20%. Após a realização de ensaios de avaliação do desempenho do teste em duas etapas, sempre considerando o critério da amplitude da diferença entre densidades ópticas de soros-controle positivos e negativos, foram obtidos os resultados que se seguem. A concentração de 1 µg de antígeno por orifício foi a que proporcionou, na maioria das vezes, a maior diferenciação entre soros positivos e negativos com todos os cinco antígenos estudados. As diluições 1:25 de soros e 1: 5.000 de conjugado também foram as que se destacaram, à exceção do antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*, que teve melhor desempenho quando o conjugado foi diluído a 1:2.500 vezes. O leite desnatado foi a melhor substância bloqueadora dos sítios reativos remanescentes da placa. Embora os antígenos de larva de *T. solium* tenham proporcionado valores mais elevados de sensibilidade, os antígenos de larva de *T. crassiceps* também mostraram bom desempenho no diagnóstico de cisticercose bovina. A escolha de diferentes grupos de soros-controle para o cálculo do ponto de corte interferiu de forma expressiva no desempenho do teste ELISA. Pode-se concluir que o teste ELISA para detecção de anticorpos apresenta deficiências no diagnóstico de animais destinados ao abate, em virtude de sua baixa sensibilidade (5 a 32%) para diferentes antígenos, quando se consideram soros de animais com infecção natural, geralmente discreta. No entanto, no caso de animais infectados experimentalmente, a sensibilidade se mostrou elevada, 75 a 90%, para diferentes antígenos.

O teste ainda pode ser considerado útil na diferenciação entre a cisticercose e outras doenças, devido às suas elevadas taxas de especificidade (81 a 100%).

ABSTRACT

MONTEIRO, Lilian, Lameck, M.S., Universidade Federal de Viçosa, december 2004.

Utilization of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* metacestodes antigens in ELISA test for the diagnosis of bovine cysticercosis. Adviser: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.
Committee members: Paula Dias Bevilacqüa and Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

This study was carried out with the purpose to develop an serological diagnosis protocol of bovine cysticercosis for the ELISA test using two metacestodes antigens of *Taenia crassiceps* and three of *Taenia solium*. There were used 20 sera of experimentally infected cattle with *T. saginata* eggs, 60 of cattle with natural infection, diagnosed at slaughterhouses, five of cattle negative for cisticercose, reared in isolation, 55 of negative bovine in slaughterhouses and 10 of bovine with actinomicosis (n=2), actinobacilosis (n=1), fasciolosis (n=1) diagnosed at slaughterhouse and of experimentally infected cattle with *Anaplasma marginale* (n=3), *Babesia* sp. (n=2) and concomitant infection for *Anaplasma marginale* and *Babesia bovis* (n=1). There were used the total and fluid cistic antigens of *T. Crassiceps* metacestodes and escólex and membrane antigens of *T. solium* metacestodes in ELISA test, after previous characterization in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in gradient 5 to 20%. The better antigen concentration was 1 µg and the better sera and conjugated dilutions were 1:25 and 1:5.000, respectively. Although the *T. solium* antigens have provided the most sensibility values, the *T. crassiceps* antigens also showed good performance to the bovine cysticercosis diagnosis. Different control serum groups employed for the cut-off calculation had changed the ELISA test results. We can concluded that the ELISA test for antibodies detection presents deficiencies in the diagnosis of naturally infected animals that showed low sensibility (5 to 32%) for different antigens. However, for experimentally infected cattle, the sensibility was high, 75 to 90% for different antigens. The test could still be considered useful in the differentiation between the cisticercose and other diseases, due to its high specificity rates (81 to 100%).

1. INTRODUÇÃO

A cisticercose bovina tem como agente etiológico a larva de *Taenia saginata*, pertencente à classe *Cestoidea*, ordem *Cyclophyllidea*, família *Taeniidae* e gênero *Taenia* (Urquhart et al., 1990). O ciclo do parasita inclui dois hospedeiros, um intermediário, que abriga a forma larvar, e um definitivo, que abriga a forma adulta, além de uma fase de vida livre. Esta doença é considerada uma zoonose, tendo o ser humano como único hospedeiro definitivo; a forma larvar tem como principais hospedeiros os bovinos e os búfalos (Ungar et al., 2001).

Dentre alguns fatores determinantes para a ocorrência do complexo teníase-cisticercose destacam-se o precário saneamento básico, as baixas condições sócio-econômicas da população, a falta de orientação acerca dos hábitos corretos de alimentação e higiene pessoal, a criação de animais sem condições adequadas de higiene e com grande proximidade do ser humano, a precariedade e ineficiência dos serviços de inspeção e vigilância sanitária, bem como o elevado comércio clandestino de carnes (Freitas et al., 1996).

Nos países onde há criação bovina, a cisticercose se constitui em uma das doenças mais difundidas. Pelo fato de seu ciclo evolutivo passar pela teníase humana, a importância que reveste seu estudo abrange tanto a área da Medicina Veterinária quanto a da Saúde Pública (Zampini, 1994).

Em termos econômicos, a importância dessa doença está associada aos prejuízos verificados no abate, quando as carcaças acometidas são julgadas e possivelmente rejeitadas parcial ou totalmente (Ungar & Germano, 1992; Queiroz et al., 2000).

Os princípios de modernização da inspeção sanitária em matadouros, aprovados pela Federação Veterinária Européia, privilegiam a integração entre os médicos veterinários responsáveis pelas inspeções *ante mortem* e *post mortem*, e os que atuam na defesa sanitária animal no campo pecuário. De outro lado, valorizam o incremento do apoio diagnóstico laboratorial no matadouro, vinculando a informação contínua de dados aos segmentos de

origem dos animais, promovendo uma retroalimentação do sistema de controle das doenças (Dias, 1995).

A frequência da cisticercose bovina, via de regra, é determinada a partir de dados obtidos pelos serviços de inspeção em matadouros. Contudo, isto não expressa a realidade, pois um grande número de animais são abatidos clandestinamente e muitos estabelecimentos não dispõem do recurso da inspeção da carne. Esta situação se agrava ainda pela resistência de produtores de áreas endêmicas em destinar os animais suspeitos a matadouros inspecionados, com o intuito de evitar eventuais condenações.

Pondera-se ainda que o método de inspeção realizado nos estabelecimentos corresponde ao exame anátomo-patológico, o qual apresenta baixa sensibilidade. Este fato reforça a necessidade da implementação de métodos diagnósticos mais confiáveis para a detecção de animais infectados, independente da localização do cisto no organismo do animal, visando o aumento da eficiência do diagnóstico da cisticercose (Walther & Koske, 1980; Ogunrinade & Oyekole, 1990).

Levantamentos complementares ao diagnóstico *post-mortem*, utilizando exames sorológicos, como o teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), poderão contribuir para a precisão dos dados oficiais em estabelecimentos inspecionados; podendo ainda, servir de instrumento para a colheita de dados sanitários da situação atual do abate, onde não existe estrutura para inspeção ou quando existe, mas é pouco explorada.

Há necessidade de se desenvolver um modelo animal, de fácil manutenção em laboratório, como fonte alternativa de obtenção de parasitas para o preparo de antígenos heterólogos adequados a serem usados em testes diagnósticos. Bovinos com infecção natural são mantidos na clandestinidade e de difícil manipulação experimental, dificultando a escolha de antígenos adequados e em quantidade suficiente para garantir a homogeneidade e o controle de qualidade dos lotes antigênicos (Vaz, 1994). Outro fator que dificulta a obtenção de antígenos homólogos de larva de *T. saginata* em quantidade é o baixo grau de infecção dos animais parasitados (Geerts et al., 1981a).

A *Taenia crassiceps* é um cestódeo comum em raposas na Europa, cuja forma larvária (*Cysticercus longicollis*), encontrada em pequenos roedores (Freeman, 1962), tem sido recomendada no preparo de antígenos para diagnóstico da cisticercose suína e humana, revelando diversas vantagens sobre os antígenos homólogos de *Taenia solium*. Alguns autores têm explorado o uso desse antígeno também para diagnóstico da cisticercose bovina, por propiciar, em certas ocasiões, resultados comparáveis àqueles obtidos com o uso de antígenos

homólogos (Geerts et al., 1981b). As vantagens do emprego de antígenos heterólogos no diagnóstico da cisticercose também são destacadas por Hayunga et al. (1991a).

A introdução do antígeno de larva de *T. crassiceps* em testes sorológicos para diagnóstico da cisticercose bovina pode minimizar as variações na qualidade dos antígenos entre os laboratórios que os preparam (Larralde et al., 1990; Mc Manus et al., 1991).

Minozzo et al. (2004) destacaram a utilização de antígenos de larva de *T. solium* no diagnóstico da cisticercose bovina, tendo obtido resultados favoráveis ao seu emprego em testes sorológicos.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma proposta de diagnóstico sorológico da cisticercose bovina pelo teste ELISA para dois antígenos de larvas de *T. crassiceps* e três de *T. solium*, valendo-se dos seguintes objetivos específicos:

- Análise do comportamento dos antígenos total (T-Tcra) e vesicular (V-Tcra) de larva de *T. crassiceps* e antígenos total (T-Tsol), de escólex (E-Tsol) e de membrana (M-Tsol) de larva de *T. solium* em reações imunológicas avaliadas no teste ELISA frente a soros controles negativos para a cisticercose e positivos para a cisticercose e outras enfermidades em bovinos.

- Estudo de alguns critérios de padronização do teste ELISA para a cisticercose bovina, ajustando o teste para uma proposta de aplicação prática.

- Caracterização dos antígenos pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos taxonômicos e morfológicos da *Taenia saginata*

A *Taenia saginata* foi agrupada à família Taeniidae por Ludwig em 1886. Em 1758, Linnaeus descreveu o gênero *Taenia*, e Goeze, em 1782, identificou a espécie *Taenia saginata* (Soulsby, 1982). Em 1800, Zeder criou o gênero *Cysticercus* para a forma larvar do parasita (Nascimento, 2000).

O verme adulto possui uma cabeça ou escólex contendo órgãos de fixação, um pescoço curto não-segmentado e uma cadeia de segmentos. A cadeia é conhecida como estróbilo e cada segmento representa uma proglote (Urquhart et al, 1990).

O comprimento da *T. saginata* adulta varia de 4 a 8 metros, podendo chegar, raramente, a 25 metros (Soulsby, 1982). Seu escólex, excepcional entre as espécies de *Taenia*, possui forma quadrangular e não possui rostelo nem ganchos. Já o de *T. solium* possui forma arredondada, possuindo rostelo com dupla fileira de ganchos (Urquhart et al, 1990).

O número de ramificações uterinas laterais ocasionalmente pode ser usado como critério para diferenciar as proglotes de *T. saginata* e *T. solium*. As proglotes grávidas de *T. saginata* contêm cerca de 80.000 ovos cada uma e o útero possui de 14 a 32 ramificações laterais. Já as proglotes grávidas de *T. solium* contêm cerca de 40.000 ovos e o útero possui de 7 a 16 ramificações laterais (Soulsby, 1982). As ramificações uterinas são do tipo dendrítica na *T. solium* e do tipo dicotômica na *T. saginata* (Nascimento, 2000). O ovário de *T. saginata* é bilobulado, enquanto que o de *T. solium* possui três lóbulos (Soulsby, 1982).

As proglotes se desenvolvem continuamente da região do colo, tornando-se sexualmente maduras na porção final do estróbilo (Urquhart et al, 1990). As proglotes jovens são mais curtas do que largas (Nascimento, 2000). Cada proglote é hermafrodita, com um ou dois conjuntos de órgãos reprodutores; os poros genitais geralmente se abrem na borda ou bordas laterais do segmento. Podem ocorrer autofertilização e fertilização cruzada entre as

proglotes. Os segmentos grávidos, em geral, saem intactos do estróbilo e são eliminados com as fezes. A eliminação de proglotes de *T. saginata* pelo hospedeiro ocorre de forma ativa, sendo expulsas com as fezes ou destacadas individualmente. Por possuírem musculatura pouco desenvolvida, as proglotes de *T. solium* são eliminadas passivamente com as fezes. Fora do corpo, os ovos são liberados por desintegração do segmento ou são expelidos através do poro genital (Urquhart et al, 1990).

O ovo é constituído pelo embrião hexacanto (seis ganchos) ou oncosfera, uma “casca” radialmente estriada, escura e espessa chamada embrióforo e uma casca verdadeira, que é uma membrana delicada que freqüentemente se perde ainda no útero (Urquhart et al, 1990). Os ovos de *T. saginata* têm diâmetro de 46-50 por 39-41 μm , enquanto os de *T. solium* têm de 26 a 34 μm de diâmetro. Possuem forma ovalada na *T. saginata* e esférica na *T. solium* (Soulsby, 1982).

O cisticerco maduro (*Cysticercus bovis*) é branco-acinzentado, possuindo dimensões de 7 a 10 mm de comprimento e 4 a 6 mm de largura, está cheio de líquido, no qual o escólex invaginado geralmente é visto com nitidez. Assim como no cestóide adulto, o cisticerco não possui rostelo ou ganchos (Urquhart et al, 1990).

2.2. Ciclo evolutivo da *Taenia saginata*

O ciclo típico deste cestóide é indireto, com um hospedeiro intermediário. Quando o metacestóide ou cisticerco é ingerido pelo hospedeiro definitivo, o escólex evaginado se fixa à mucosa, o restante da estrutura é digerido e começa a se desenvolver uma cadeia de proglotes a partir da base do escólex (Urquhart et al, 1990). O cestóide adulto é encontrado no intestino delgado do hospedeiro definitivo, com seus segmentos e ovos atingindo o meio exterior através das fezes. Um único hospedeiro pode eliminar, diariamente, 500 mil ovos ou mais, seja no interior das proglotes ou livres nas fezes (Ungar et al., 2001).

Quando o ovo é ingerido pelo hospedeiro intermediário, as secreções gástrica e intestinal digerem o embrióforo e ativam a oncosfera. Esta atravessa a mucosa e chega na circulação sanguínea, de onde segue para a musculatura estriada. No início, é macroscopicamente visível cerca de duas semanas mais tarde como uma mancha pálida, semitransparente, com cerca de 1 mm de diâmetro. Posteriormente, é encerrada pelo hospedeiro em uma cápsula fibrosa fina, mas, apesar disso, o escólex ainda pode ser visto.

Quando morrem, costumam ser substituídos por uma massa friável, caseosa, que pode tornar-se calcificada. Frequentemente, estão presentes cistos vivos e mortos em uma mesma carcaça (Urquhart et al, 1990).

2.3. Epidemiologia e controle do complexo teníase-cisticercose

O ser humano é o único hospedeiro da forma adulta da *T. saginata*, cuja forma larvar além dos hospedeiros principais (bovinos e búfalos), também pode ser encontrada em ruminantes silvestres como lhama, rena, girafa, gnu, antílope e gazela (Ungar et al., 2001).

Considerando-se a diminuição da prevalência da cisticercose suína, decorrente de mudanças no processo de criação, o aumento de casos de cisticercose bovina e de neurocisticercose humana, muito embora tenha ocorrido uma melhoria dos métodos de diagnóstico, tem levado alguns autores no Brasil a atribuir maior importância de saúde pública à cisticercose bovina a partir da suspeita de vínculo entre a larva de *T. saginata* e a cisticercose humana (Santos, 1996; Queiroz et al., 2000).

Embora exista esta suspeita, até o presente momento não há comprovação científica do envolvimento da *T. saginata* com a ocorrência de casos de neurocisticercose humana.

O complexo teníase-cisticercose, causado pela *T. saginata*, apresenta distribuição cosmopolita, sendo encontrado em vários países, principalmente naqueles onde a pecuária bovina apresenta destaque como setor agropecuário (Souza et al., 1997). A cisticercose bovina assume padrões epidemiológicos distintos conforme as características dos países onde ocorre.

Conforme relatam Dorny et al. (2002), apesar da possibilidade de assumir distribuição mundial, a doença tem maior importância nos países em desenvolvimento. De fato, países em desenvolvimento, como em muitas partes da África, Ásia e América Latina, possuem alta prevalência de cisticercose. Esta situação é favorecida pela criação de bovinos em regime extensivo, havendo contaminação dos animais pela ingestão de ovos de *T. saginata* junto às pastagens ou à água. Condições precárias de saneamento, bem como hábitos higiênicos inadequados contribuem para a manutenção da doença nesses locais (Urquhart et al., 1990; Pfuetszenreiter & Ávila-Pires, 2000).

Nos países desenvolvidos, como em certas áreas da Europa, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia, a prevalência da cisticercose é baixa, visto serem altos os padrões de sanidade dessas regiões. Além disso, a carne consumida é cuidadosamente inspecionada e,

em geral, totalmente cozida antes do consumo. Surtos esporádicos, com alta proporção de bovinos infectados em propriedades particulares podem ocorrer, estando geralmente associados ao uso de matéria orgânica humana em pastos como fertilizantes, outras vezes por infecção de tratadores isoladamente, ou como consequência do emprego de mão-de-obra oriunda de países com alta prevalência de cisticercose (Urquhart et al., 1990).

A forma de criação é um fator de suma importância na determinação da frequência de cisticercose observada entre os animais abatidos. Souza et al. (1997) atribuem à forma de criação intensiva, a qual possibilita um contato mais íntimo entre ser humano e animal, o aumento da frequência de cisticercose bovina no estado de Minas Gerais entre os anos de 1990 a 1994. No Zâmbia, a elevada soroprevalência de cisticercose bovina encontrada em fazendas de engorda de gado foi relacionada ao contato contínuo entre ser humano e animal, bem como ao emprego de mão-de-obra ocasional nessas propriedades (Dorny et al., 2002).

Segundo Ungar et al. (2001), a água de esgoto não tratada se constitui numa importante via de transmissão da cisticercose bovina, notadamente quando da sua utilização como fertilizante em pastagens ou mesmo quando contamina a água de bebida dos animais, podendo causar surtos de cisticercose nos rebanhos.

Ovos de *T. saginata* podem permanecer viáveis durante semanas e até alguns meses sob diversas condições ambientais (Ungar et al., 2001), podendo sobreviver por mais de 200 dias em fezes sedimentadas (Urquhart et al., 1990). Apesar de vetores mecânicos, como besouros coprófagos, moscas, minhocas, baratas e carreadores como gaiivotas, galinhas e pardais não serem essenciais na transmissão da doença, favorecem a disseminação dos ovos no ambiente (Ungar et al., 2001).

Os principais fatores que favorecem a contaminação do ambiente com os ovos abrangem a higiene pessoal deficiente e o saneamento público ou local precários, associados ao fácil deslocamento do ser humano representado, sobretudo, pelas viagens em massa e pelas migrações de trabalhadores (Ungar et al., 2001).

Uma pessoa infectada pode eliminar 500 mil ovos ou mais, diariamente, sejam livres nas fezes ou no interior das proglotes, cada uma contendo cerca de 100.000 ovos, que podem sobreviver na pastagem durante vários meses (Urquhart et al., 1990).

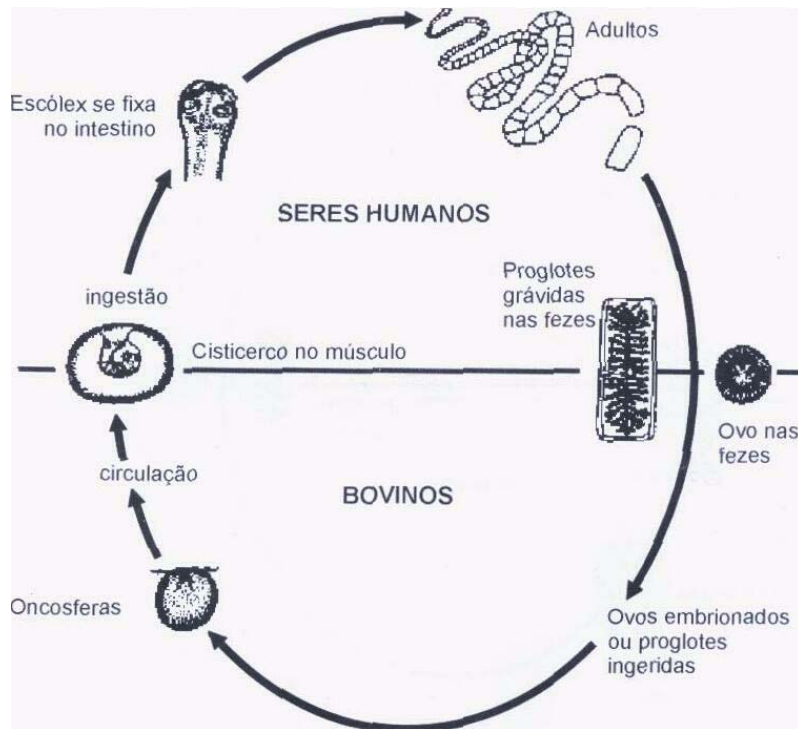


Figura 1. Ciclo biológico da *Taenia saginata* (INPPAZ, 2001).

Os métodos de prevenção e controle do complexo teníase-cisticercose abrangem medidas aplicáveis às populações humana e bovina e ao ambiente. As medidas aplicáveis à população humana seriam a educação sanitária, diagnóstico e tratamento de casos positivos (Ungar et al., 2001).

Com relação à população bovina, as medidas de controle da cisticercose estão relacionadas ao diagnóstico *post-mortem* realizado em estabelecimentos de abate e à destinação adequada das carcaças e órgãos afetados, que depende do grau de infecção dos mesmos (Ungar et al., 2001). Medidas de controle aplicáveis ao ambiente estão relacionadas, primordialmente, à educação sanitária e têm como objetivo a orientação da população quanto ao destino adequado das fezes humanas, de forma a evitar a contaminação da água, do solo e alimentos (Ungar et al., 2001). Considerando-se o papel do esgoto não tratado na transmissão da cisticercose, o tratamento do esgoto sanitário também pode ser incluído dentre as principais medidas de controle aplicáveis ao ambiente.

2.4. Prevalência da cisticercose bovina

Dados obtidos junto ao Serviço de Inspeção Federal (SIF), referentes a diversos municípios do Rio Grande do Sul, onde se abateram bovinos de 1963 a 1971, mostraram que 1,8% do total de animais abatidos no período tinham cisticercose (Moreira et al., 1971).

Barra & Ferreira (1983) registraram que, dentre vários estados de procedência dos animais abatidos no período de janeiro de 1983, em matadouros sob SIF no estado de São Paulo, o estado de Mato Grosso apresentou 1,2% de casos, contra 4,9% de casos observados para o estado São Paulo. Já no período de fevereiro de 1983, o estado de São Paulo respondeu por 4,78% dos casos, contra 1,68% observado para bovinos procedentes de Goiás (Barra & Ferreira, 1984).

Zampini (1994) realizou um levantamento, a partir de dados obtidos junto ao SIF, para determinar a prevalência da cisticercose bovina no Paraná no período de 1982 a 1988, tendo encontrado uma prevalência de 2,79% naquele estado. Os níveis não tiveram variação acentuada de ano para ano, permanecendo numa estreita faixa de 2,4% a 3,02%.

Ungar & Germano (1992) determinaram a prevalência da cisticercose bovina no estado de São Paulo através da análise de fichas obtidas em matadouros sob SIF no ano de 1986. O total de abate no ano foi de 896.654 cabeças, tendo sido diagnosticados 48.957 casos de cisticercose, correspondendo a uma prevalência de 5,5%.

Foram coletados por Souza et al. (1997) dados de 144.683 animais procedentes de 157 municípios do estado de Minas Gerais, abatidos no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1994 em frigorífico sob SIF. Do total de animais, 6.011 apresentaram-se parasitados pela cisticercose bovina, o que corresponde a uma prevalência de 4,15%. Dos 157 municípios estudados, 94 tiveram casos de animais positivos.

Em um levantamento da prevalência da cisticercose bovina no ano de 1992, no município de Tupã-SP, Manhoso (1996) encontrou que 12,5% dos bovinos abatidos durante aquele ano se encontravam parasitados pelo *Cysticercus bovis*. Os cisticercos encontrados eram, na maioria, calcificados. Em 1993, no mesmo município, foi encontrado um total de 10,8% de animais com cisticercose, sendo o coração e a cabeça os locais mais parasitados nos dois anos considerados.

Através de um estudo para determinar a frequência da ocorrência de cisticercose bovina, por estado de procedência dos animais positivos abatidos em um estabelecimento sob SIF, Reis et al. (1996) observaram que Minas Gerais foi o estado com maior frequência da

parasitose (2,79%), seguido de Goiás (1,05%), Pará (0,98%) e Mato Grosso (0,44%). Não foram constatados casos de animais positivos provenientes dos estados de São Paulo e Tocantins. No período do estudo, compreendido entre janeiro de 1979 e dezembro de 1993, 336.723 bovinos foram abatidos e 6.314 apresentavam cisticercose (1,87%).

Reis & Raghiante (2000) investigaram a tendência da cisticercose bovina de 1994 a 1998 em animais procedentes dos principais municípios da região do Triângulo Mineiro, abatidos em frigorífico sob inspeção federal. Concluíram que a prevalência da cisticercose bovina no período considerado foi de 3,2%, tendo sido observada uma tendência para o crescimento dos casos da doença nos municípios considerados.

Em um levantamento realizado no início de agosto ao final de outubro de 1999 em Uberlândia-MG, visando comparar as frequências de ocorrência de cisticercose em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal e Serviço de Inspeção Municipal, Moreira et al. (2001) encontraram um percentual igual a 10% de carcaças parasitadas para o Matadouro sob Inspeção Municipal e 4% para o Matadouro sob Inspeção Federal, tendo sido constatado que a probabilidade de serem encontradas carcaças com cisticercose é 2,69 vezes maior para o primeiro padrão de matadouro em comparação com o segundo. Este fato levanta a hipótese de que a frequência geralmente apresentada nas diversas publicações sobre o tema, baseada em dados do serviço de Inspeção Federal, possa estar sub-representada para o município ou região considerada, devendo ser complementada com dados de outras fontes (Moreira et al., 2001).

Fukuda et al. (2003) registraram uma prevalência média de 4,28% de cisticercose bovina entre os anos de 1980 a 2001 no estado de São Paulo. A proporção de cistos, conforme seu estágio evolutivo, foi de 73,64% de cistos calcificados e de 26,36% de cistos vivos. Em um estabelecimento sob SIF, localizado no município de Barretos, a prevalência média observada pelos mesmos autores entre os anos de 1999 a 2001 foi de 4,47%. A maioria dos casos foi de cisticercose calcificada (58,91%).

2.5. Resposta imunológica dos bovinos à cisticercose

De forma geral, conforme ressaltam Flisser et al. (1979), observa-se que a exposição do hospedeiro a diferentes formas de antígeno parasitário induz resistência ao desafio subsequente, no entanto o grau de resistência pode variar.

Conforme Gallie & Sewel (1974b), a idade do hospedeiro não é o único fator envolvido no desenvolvimento de resistência à reinfecção. Entretanto, esses autores relatam que parece haver uma complexa relação entre a idade do bezerro à primeira infecção, o tamanho da dose infectante, o intervalo de tempo entre infecções sucessivas e o grau de resistência que é desenvolvido e mantido por esses animais.

Em um experimento onde neonatos de dois a três dias de idade foram infectados com ovos de *T. saginata* e desafiados 12 meses depois, Gallie & Sewell (1974a) observaram que a resistência à reinfecção com *T. saginata* em bezerros não é necessariamente associada a uma forte resposta sorológica. Observaram ainda que a infecção precoce desses animais não interferiu com sua habilidade em desenvolver resistência à reinfecção. No entanto, segundo os autores, essa falha no desenvolvimento de uma resposta sorológica forte poderia dificultar o diagnóstico sorológico de bezerros no campo.

Com o teste de hemaglutinação indireta, Gallie e Sewell (1974b) observaram picos de anticorpos seis meses após a infecção em animais infectados experimentalmente aos três meses de idade. Por meio deste teste, a detecção inicial de anticorpos hemaglutinantes foi possível a partir de quatro a cinco semanas após a infecção. Pelo teste de microdifusão em gel, cerca de duas semanas após a infecção inicial, pôde ser detectada a precipitação de anticorpos no soro de todos os animais inoculados.

Smith et al. (1991) demonstraram que o nível de anticorpos anti-*T. saginata* detectados pelo teste ELISA esteve diretamente relacionado à dose de desafio com ovos infectantes e ao número de cisticercos estabelecidos em animais infectados experimentalmente. Apesar da relação direta entre dose infectante e absorvância, observou-se um aumento definido no nível de IgG detectável entre 40 e 60 dias após a infecção na maioria dos grupos testados. Em outra ocasião, Kyvsgaard et al. (1991) verificaram que a magnitude da resposta de anticorpos usando um teste ELISA esteve mais ou menos correlacionada ao número de cistos encontrados nas carcaças durante o abate.

Vacinação intramuscular de bezerros com oncosferas homólogas normais ou irradiadas induziu elevada resistência contra o desafio oral com ovos de *T. saginata*. Após vacinação e desafio dos animais, foi demonstrado através de imunofluorescência indireta que os anticorpos específicos levam geralmente três semanas para aparecerem. A vacina atenuada mostrou ser de alta eficiência sem produzir cisticercose pós-vacinal no sítio de injeção. No mesmo experimento, uma dose relativamente elevada de anti-soro homólogo injetado pela via

subcutânea três dias antes do desafio oral falhou em prevenir o desenvolvimento de uma cisticercose generalizada (Wikerhauser et al., 1974).

Rickard & Adolph (1976) utilizaram antígenos de secreção e excreção (ES) de *Taenia ovis*, *Taenia hydatigena* e *T. saginata* na imunização de bezerros contra cisticercose. Os antígenos ES de *T. saginata* foram altamente protetores, garantindo proteção maior do que aquela conferida pelos antígenos heterólogos. No entanto, estes últimos também foram capazes de estimularem uma significativa imunidade. Utilizando a tecnologia do DNA recombinante, Lightowlers et al. (1996) clonaram antígenos de oncosfera de *T. saginata*, e utilizaram os mesmos na imunização de bovinos desafiados experimentalmente com ovos do parasita. A vacina foi capaz de induzir altos níveis de proteção nos animais que a receberam, demonstrando o potencial de poder vir a ser utilizada na prática para prevenir a infecção por *T. saginata* em bovinos.

2.6. Antígenos empregados no diagnóstico da cisticercose

Além de várias preparações utilizando o antígeno homólogo de *T. saginata* ou de sua larva (*C. bovis*), o uso de antígenos heterólogos em testes sorológicos para diagnóstico de cisticercose bovina também vem sendo estudado.

A *T. crassiceps* tem sido recomendada no preparo de antígenos para diagnóstico das cisticercoses suína e humana, revelando diversas vantagens sobre os antígenos homólogos de *T. solium*. Embora ainda haja relativamente poucas pesquisas utilizando antígenos de *T. crassiceps*, acredita-se que este cestódeo possa ser um antígeno alternativo ao de *T. saginata*, permitindo assim um diagnóstico mais específico da cisticercose causada pela forma larvária de *T. saginata* (Geerts et al., 1981a).

Hilwing & Cramer (1983) evidenciaram uma notável reação cruzada entre os antígenos de *T. saginata* e *T. crassiceps* quando estes foram usados para sensibilizar animais, ou mesmo quando empregados como agentes para teste intradérmico a fim de estimular a hipersensibilidade tardia, numa avaliação do potencial de ambos os antígenos na detecção de cisticercose bovina *ante-mortem*.

Hayunga et al. (1991a) afirmaram que a utilização de larvas de *T. crassiceps* e *T. taeniaeformis* como antígenos potenciais em testes sorológicos para diagnóstico da cisticercose bovina oferece a perspectiva de uma fonte segura de antígenos para o propósito considerado, visto que essas duas espécies podem ser mantidas em laboratório.

Minozzo et al. (2004) relataram o emprego de antígeno de escólex de larva de *T. solium* em teste imunoenzimático para diagnóstico de cisticercose bovina. Os resultados obtidos foram satisfatórios, embora tenham utilizado um único perfil de amostras, oriundas de bovinos experimentalmente infectados.

Harrison et al. (1981b) destacaram que extrato de larva de *T. crassiceps* e produtos de metabolismo de larvas de *T. saginata* podem ser antígenos promissores em testes sorológicos para diagnóstico da cisticercose bovina. Uma fração do líquido vesicular de larva de *T. hydatigena* solúvel em sulfato de amônia (ThFAS) também vem sendo estudada como antígeno potencial para diagnóstico de cisticercose bovina (Smith et al., 1990; Smith et al., 1991; Hayunga et al., 1991a; Hayunga et al., 1991b; Bogh et al., 1996).

2.7. Diagnóstico imunológico da cisticercose bovina

Murrel et al. (1986) afirmaram que o imunodiagnóstico da cisticercose bovina poderia ser de grande utilidade para o diagnóstico de animais a campo, visto que os animais infectados poderiam, desta forma, ser identificados e tratados antes do abate, o que levaria a uma redução das perdas econômicas dos pecuaristas. Outra contribuição importante seria nos estudos epidemiológicos direcionados à identificação das fontes de infecção.

De acordo com Geerts et al. (1981a), para a detecção da cisticercose é necessária uma técnica altamente sensível, pois o alto grau de adaptação da larva ao hospedeiro resulta em uma pobre produção de anticorpos e, em condições naturais, a maioria dos bovinos infectados exibe baixos graus de infecção. Smith et al. (1991) afirmaram que os baixos níveis de anticorpos produzidos em infecções leves muitas vezes dificultam na seleção de um ponto de corte e na interpretação dos achados em testes sorológicos como o ELISA. Segundo Smith et al. (1990), o desenvolvimento de anticorpos anti-cisticercose é dependente, no mínimo, da magnitude da infecção estabelecida, e talvez também da fase de infecção em que os animais se encontram quando são testados.

Dentre as técnicas que vêm sendo pesquisadas, destaca-se o teste ELISA, por ser versátil, uma vez que pode ser usado como um simples indicador da presença de anticorpos no soro ou como uma técnica quantitativa muito sensível quando os resultados são lidos em um espectrofotômetro (Harrison et al., 1981a). Murrel et al. (1986) também destacaram como vantagem a adaptabilidade do teste ELISA à automatização dos equipamentos, permitindo seu emprego em diagnóstico de larga escala.

Queiroz et al. (2000) destacaram a necessidade de se pesquisar e sugerir a implementação do teste ELISA como método auxiliar à inspeção visual, buscando maior eficiência no diagnóstico da cisticercose bovina.

Kyvsgaard et al. (1991), avaliando um imunoenensaio enzimático para detecção de cisticercose em bovinos, encontraram um aumento acentuado nos valores de anticorpos específicos três a quatro semanas após a infecção experimental em bezerros. O ELISA testado foi considerado sensível para detectar um aumento no título de anticorpos quando repetidas amostras foram obtidas desses animais. Contudo, o principal problema encontrado no uso do teste para diagnóstico individual foi a sua especificidade. Mesmo assim, o ensaio foi considerado útil na investigação de surtos de cisticercose para determinar a extensão e o padrão da infecção no rebanho.

Comparando o teste ELISA com a hemaglutinação indireta, Harrison et al. (1981a) observaram que ambos os testes foram capazes de detectar uma resposta humoral à cisticercose de duas a seis semanas após a infecção em animais infectados entre três meses e um ano de idade.

Em uma avaliação comparativa, Geerts et al. (1981b) utilizaram extrato hidrossolúvel de proglotes de *T. saginata* como fonte de antígeno para imunoeletoforese (IEF) e contraimunoeletoforese (CIE), e para o teste ELISA, antígeno de larva de *T. crassiceps*. Sob condições experimentais, a IEF demonstrou ser um teste bastante específico na detecção de anticorpos contra a cisticercose bovina, embora tenha lhe faltado o nível desejado de sensibilidade em certas ocasiões. A CIE, por sua vez, é um método rápido, simples e mais sensível, mas falha em prover um nível desejado de especificidade. O ELISA parece ser o teste de escolha por fornecer desejadas taxas de sensibilidade e especificidade, pelo menos sob condições experimentais. Sob condições naturais, a sensibilidade do ELISA foi baixa (37,5%) e a especificidade alta (95,7%), conforme observaram Geerts et al. (1981a), contrariando as observações de Kyvsgaard et al. (1991).

Minozzo et al. (2004), empregando antígeno de escólex de larva de *T. solium* e total de larvas de *T. crassiceps* e de *T. saginata* em teste ELISA indireto, observaram um aumento no título de anticorpos a partir de 36 dias de infecção com todos os tipos de antígenos usados, destacando-se a reação ao antígeno de *C. cellulosae* sobre os outros dois.

Empregando o antígeno ThFAS em um teste ELISA, Smith et al. (1990) obtiveram altos valores de densidade ótica (D.O.) com soros-controle positivos, o contrário ocorrendo

com os soros negativos. Contudo, quando o teste foi aplicado em soros de animais naturalmente infectados, seu desempenho foi questionável.

Ao submeterem o antígeno ThFAS à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e, em seguida, efetuarem o Imunoblot, Hayunga et al. (1991a) observaram que uma banda peptídica menor que 12 kD do antígeno reagiu especificamente com soros de bovinos infectados experimentalmente por *T. saginata*. Ao contrário, esta banda não reagiu com soros controles de animais não infectados, nem com soros de bovinos infectados por *Fasciola hepatica* ou *Brucella abortus*. No entanto, a baixa carga parasitária de alguns animais infectados resultou na detecção apenas tardia da infecção. Segundo os mesmos autores, é provável que a sensibilidade do ensaio possa ser reduzida em situações naturais onde, na maioria das vezes, se observam infecções leves.

Segundo Hayunga et al. (1991a), a banda menor que 12 kD de líquido vesicular e antígeno de membrana obtidos de larvas de *T. crassiceps* se mostrou antigenicamente similar à banda equivalente do antígeno de *T. hydatigena*, tendo reagido especificamente com soro de bovinos infectados no Imunoblot. O mesmo achado se deu quando se empregou antígeno de líquido vesicular de *T. taeniaeformis*.

O antígeno ThFAS possui componentes em sua estrutura que reagem com soros de animais infectados por *F. hepatica* e de animais sem cisticercose. Isso possivelmente contribuiria para o aparecimento de reações falso-positivas quando da utilização do antígeno ThFAS em teste ELISA convencional (Hayunga et al., 1991a). Após purificarem o antígeno ThFAS através de um método de cromatografia líquida, e utilizarem um eluato da coluna cromatográfica como antígeno em teste ELISA, Hayunga & Sumner (1991b) observaram que a densidade óptica dos soros-controle negativos e dos animais com fasciolose estava abaixo do ponto de corte, o que implicou em melhor desempenho do teste.

Bøgh et al. (1996) encontraram resultados comparáveis entre o Dot-ELISA e um teste ELISA modificado usando anticorpo monoclonal para detecção de antígenos circulantes de *T. saginata*.

Brandt et al. (1992) desenvolveram anticorpos monoclonais do isotipo IgM contra metabólitos de cisticercos vivos. Observaram que os anticorpos monoclonais 12G5 e 2H8 reagiram no Western Blot com componentes de um extrato somático de *T. saginata* adulta de massas moleculares 87 kD e 100 kD. Já a reação dos metabólitos de larvas de *T. saginata* contra os mesmos anticorpos monoclonais utilizando a mesma técnica, revelou uma fraca banda peptídica de 65 kD. Através de um ensaio de ELISA, antígenos circulantes puderam ser

demonstrados cinco semanas após a infecção em animais portando cisticercos vivos. Ao contrário, eles não foram demonstrados nos soros de animais que abrigavam apenas cistos mortos. O menor número de cistos que pôde ser detectado com esta técnica foi 88, contudo houve variação na capacidade de identificação de positivos pelo teste de um animal a outro. A especificidade do teste foi de 90,3%.

Ao avaliarem o desempenho de um Dot-ELISA usando os mesmos anticorpos monoclonais desenvolvidos por Brandt et al. (1992) na detecção de antígenos circulantes de larvas de *T. saginata*, Draelants et al. (1995) obtiveram um teste com especificidade de 93,5%. O teste foi capaz de detectar antígenos em apenas 4 de 11 (36%) bezerros portando menos que 100 cistos vivos, enquanto 87,5% dos animais com mais de 100 cistos vivos encontrados ao exame *post-mortem* foram detectados pela técnica. Com a redução do tempo necessário à sua realização e ainda com a melhora em sua sensibilidade, o Dot-ELISA poderia ser uma alternativa ao método visual direto no diagnóstico da cisticercose bovina.

Van Kerckhoven et al. (1998) detectaram um aumento na sensibilidade do teste ELISA para detecção de antígenos circulantes, em especial com soros de animais portando mais de 50 cistos vivos, quando utilizaram uma combinação de anticorpos monoclonais da classe IgG. Foi confirmado que anticorpos deste isotipo têm maior afinidade com os antígenos circulantes do que os de isotipo IgM. A sensibilidade do teste que era de 56% com IgM, passou para 92% com a IgG monoclonal. A especificidade teve ligeiro aumento, de 93,4% com IgM para 98,7% com IgG.

Onyango-Abuje et al. (1996b) observaram, durante uma investigação, que o teste ELISA utilizando anticorpo monoclonal para detecção de antígeno parasitário de *C. bovis* foi capaz de indicar a infecção com cisticercos vivos tanto em animais naturalmente, quanto em experimentalmente infectados. No entanto, apenas nos animais com infecção experimental, os valores de leitura no teste foram significativamente correlacionados à carga total de cistos vivos. No entanto, os mesmos autores observaram uma pequena associação entre a resposta humoral e a carga parasitária total e de cistos vivos nos animais naturalmente e experimentalmente infectados quando da utilização do ELISA para detecção de anticorpos.

Harrison et al. (1989) observaram um rápido decréscimo na quantidade de antígenos circulantes detectáveis em teste ELISA após tratamento dos bovinos infectados utilizando praziquantel. No ensaio para detecção de anticorpos contra *C. bovis*, os mesmos puderam ser demonstrados quatro semanas após a infecção dos animais. Após o tratamento com anti-helmíntico, notou-se o aumento dos níveis de anticorpos circulantes nos soros dos animais

analisados, sendo que esses níveis permaneceram elevados nas semanas seguintes ao tratamento. Enquanto no ensaio para detecção de anticorpos foram observadas reações cruzadas com soros de animais com outras patologias, a única reação cruzada no ensaio para detecção de antígeno foi com soro de humano infectado por *T. solium*.

Empregando um teste ELISA para detecção de antígeno circulante, Dorny et al. (2000) detectaram 36 (3,09%) casos positivos dentre 1.164 animais abatidos. Com o teste empregado, a prevalência da cisticercose foi maior acima de dez vezes em relação à registrada pela inspeção de rotina, demonstrando que o teste pode ser uma útil ferramenta soropidemiológica.

2.8. Rotina de controle da cisticercose bovina

Várias ações têm sido aplicadas como medida de controle da cisticercose bovina através da quebra da cadeia de infecção, mas a inspeção de rotina em matadouros continua sendo o principal recurso de proteção da saúde pública pela interrupção da transmissão de *T. saginata* (Walther & Koske, 1980).

Nos matadouros, se desempenham funções básicas no controle do complexo teníase-cisticercose. A prevenção da teníase humana é feita através da destinação adequada de carcaças e órgãos de bovinos parasitados, a partir do exame anátomo-patológico realizado nesses estabelecimentos (Souza et al., 1997).

O regulamento do SIF (Brasil, 1980), em seu artigo 176, prevê a condenação total de carcaças com infecção intensa e rejeição parcial das partes infectadas, seguida de tratamentos pelo frio, calor ou salga das partes aparentemente sadias, nos casos de infecção discreta ou moderada. Hoje, tem sido rotina o emprego de congelamento de carcaças infectadas em estabelecimento inspecionados pelo SIF. Outras formas de tratamento e processamento da carne não garantem sua descontaminação.

Assim, pratos tradicionalmente preparados e consumidos com carne crua podem ser fonte de cistos viáveis se a carne usada na preparação não for inspecionada e estiver contaminada. Carnes “mal passadas” ou lingüiças que estejam contaminadas com cistos, podem transmitir a teníase ao consumidor destes alimentos. (Souza et al., 1997).

Quanto ao congelamento da carne como recurso de controle da cisticercose, algumas pesquisas vêm sendo realizadas visando determinar a melhor combinação tempo-temperatura que seja capaz de inviabilizar os cistos viáveis. Bezerros experimentalmente infectados com

ovos de *T. saginata* foram abatidos 12, 16 ou 24 semanas após a infecção. Suas carcaças foram congeladas em diferentes combinações de tempo e temperatura para determinar em quais delas ocorreria a inativação de todos os cisticercos. As combinações que asseguraram a inativação de todos os cistos foram 15 dias a -5°C, 9 dias a -10°C, e 6 dias a -15°C (Hilwig et al., 1978). Almeida et al. (2003) observaram que cistos viáveis, testados à temperatura de -30°C em câmara frigorífica, tornaram-se inviabilizados a partir de oito horas de exposição ao congelamento.

Não obstante ao reconhecimento da sua importância, a inspeção de carnes por si só não pode detectar todos os cisticercos presentes nas carnes visto que, por razões de natureza estética e comercial, o inspetor normalmente não retalha todos os órgãos, vísceras e carcaças submetidos à inspeção de rotina ou posteriormente a ela (Rodrigues, 1993).

Onyango-Abuje et al. (1996a) afirmaram que a inspeção é considerada pouco sensível por contar com a detecção de cistos apenas em sítios específicos, sendo que pode acontecer de um animal ser considerado negativo e, no entanto, possuir cistos em outros locais de sua carcaça. Embora a inspeção possa detectar cistos vivos e mortos, os mortos ou calcificados são esbranquiçados e são mais fáceis de se identificar que os vivos, os quais tendem a ser rosa-pálidos e podem ser imperceptíveis na carne.

Após realizarem dissecação completa de carcaças que apresentaram um ou dois cisticercos durante a inspeção de rotina em um matadouro nos Estados Unidos, Juranek et al. (1976), detectaram a presença de cisticercos em outras partes em adição àquelas inicialmente detectadas pelo método oficial. Mais da metade das carcaças examinadas (11 de 19) continham cisticercos nas seguintes partes adicionais: coxão, cernelha, peito, costela, lombo. Cistos viáveis foram detectados em cinco destas carcaças.

Em um matadouro no Brasil, Rodrigues (1993) pesquisou a existência concomitante de outros cisticercos nos cortes mais valorizados de carcaças que, na inspeção de rotina, haviam acusado apenas um cisticerco degenerado na cabeça ou coração (infecção leve). Das 16 carcaças utilizadas no experimento, cinco delas (31,25%) acusaram a presença de cisticerco em um de seus cortes nobres fatiados, sendo que em duas delas (12,5%), os cisticercos eram vivos e em três (18,75%), eram calcificados. O autor concluiu que a presença de um único cisticerco calcificado no conjunto de órgãos, vísceras e carcaças na rotina de inspeção não isenta a carcaça da presença de cisticercos vivos em local que não seja rotineiramente examinado.

Nos bovinos, a cisticercose caracteriza-se pela presença do *C. bovis* na musculatura do animal, especificamente nos músculos da mastigação, língua, coração, musculatura dos membros, esôfago, diafragma, entre outros, que devem ser priorizados no exame anátomo-patológico (Ungar & Germano, 1991).

Comparando os resultados obtidos por dissecação e corte de carcaças bovinas com os resultados da inspeção realizada seguindo os requerimentos do “Meat Control Act” do Kênia, Walther & Koske (1980) observaram que a inspeção feita como prescreve a lei só foi capaz de detectar 23 de 60 animais infectados, representando uma eficácia de 38,3%. Durante a inspeção, os cisticercos foram mais freqüentemente encontrados no músculo tríceps, coração, língua e músculos mastigatórios, nesta ordem. Durante cuidadosa dissecação e fatiamento, 34 dos 60 animais infectados (56,7%) foram negativos para cistos nos chamados “sítios de predileção” - músculos da mastigação, língua, coração, esôfago e diafragma. A maioria dos animais tinha cistos nos membros traseiros (76,7%) e dianteiros (70%). A porcentagem de animais com cistos no coração, língua, cabeça e esôfago foi de 25%, 21,7%, 13,3% e 5%, respectivamente.

McCool (1979) encontrou cisticercos em 47 (70%) de 67 animais provenientes de uma propriedade com histórico de cisticercose bovina. Destes 70%, somente 49% tinham cistos em tecidos considerados locais de predileção, sendo que 7,5% dos cistos estavam no masséter e 6,4% no coração. Do total de 484 cistos detectados, somente 19,8% (96) estavam localizados nesses locais. Kyvsgaard et al. (1990) encontraram uma variação da porcentagem de cistos nos sítios de predileção de 12,9 a 46,9%. Foi observada uma alta densidade de cistos encontrados especialmente no coração, no masséter e no diafragma e, em menor grau, na língua. Segundo esses mesmos autores, a probabilidade de detecção dos animais infectados pela inspeção de rotina será tanto maior quanto mais elevado o nível de infecção dos animais.

Examinando 51 corações de bovinos e os músculos mastigatórios internos e externos de outros 51 bovinos no Senegal, Schandevyl et al. (1982) encontraram lesões císticas em 13,7% dos corações e em 25,5% dos músculos mastigatórios. Estas lesões continham 2,0% e 9,8% de cisticercos viáveis, respectivamente.

Analisando os padrões de distribuição de cisticercos em 20 carcaças condenadas provenientes de animais com infecção maciça, Juranek et al. (1976) relataram a ocorrência de enorme variação na intensidade da infecção. O número de cisticercos por carcaça esteve entre 16 e 2.095, com uma mediana de 213,5. Das carcaças analisadas, 40% continham menos que 100 cistos cada, 40% portavam entre 200 e 500 cistos, e 15% estavam infectadas com 1.200

ou mais cisticercos. Maiores concentrações de cisticercos foram observadas nos músculos da mastigação e no coração. Uma possível explicação para a maior frequência de cisticercos em determinados músculos pode ser o maior fluxo sanguíneo nesses músculos (Almeida et al., 2002).

Em um abatedouro na Tanzânia, de 21 bovinos com cisticercose detectados através da inspeção visual, 18 apresentaram cistos no coração, tendo sido este o órgão parasitado com maior frequência (Maeda et al., 1996). Santos et al. (2001) defenderam que o exame do coração não deve ser negligenciado na rotina de inspeção, em virtude da elevada ocorrência de *C. bovis* nesse órgão.

O exame dos pilares do diafragma não está prescrito no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal - RIISPOA, como exame de rotina, mas somente nos trabalhos de Inspeção Final, conforme o artigo 176, parágrafo 5º (Brasil, 1997). Com o objetivo de verificar qual a contribuição que traria o exame dos pilares diafragmáticos na inspeção de carnes, Santos (1993) examinou 87.674 bovinos das várias regiões dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás abatidos em matadouro sob SIF. Do total de animais examinados, 4.222 (4,93%) estavam infectados com um único cisticercos nos sítios oficialmente recomendados, sendo que 195 (4,62%) apresentaram o cisticercos localizado nos pilares diafragmáticos. A técnica aumentou a eficiência da detecção de carcaças monocisticercósicas em 4,62% no exame *post-mortem*.

Fukuda et al. (1998) examinaram 90.333 bovinos abatidos em frigorífico sob SIF, com o objetivo de comparar dois métodos de inspeção do diafragma para diagnóstico da cisticercose, examinando na própria carcaça ou destacado da mesma. No período de estudo, foi registrada uma prevalência média de cisticercose de 9,69% (8.756 casos). Destes, 1.255 cistos foram detectados no diafragma, sendo que 81 foram detectados diretamente na carcaça (6,45%) e 1.174 por reinspeção do diafragma fora da carcaça (93,55%). Segundo os autores, o emprego da reinspeção mostrou-se vantajoso, pois permitiu melhorar o índice de detecção de casos de cisticercose. A substituição do método tradicional por esse último, contribuiria com o aumento do número de casos de cisticercose detectados pelas equipes do SIF.

Devido ao grave problema acarretado à pecuária e à saúde pública, também é importante a determinação da frequência desta zoonose nas diversas regiões do país, assim como o conhecimento da procedência dos animais abatidos, o que representa um ponto de partida para a adoção de medidas de controle e profilaxia desta infecção (Reis et al., 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de soros

Foram utilizados 20 soros de bovinos infectados experimentalmente com cerca de 100.000 ovos de *T. saginata* por animal, 60 soros de bovinos com cisticercose discreta (infecção natural), com até dois cisticercos por animal, diagnosticados na rotina de inspeção *post-mortem* em matadouros, através de exame anátomo-patológico, cinco soros de bovinos negativos para cisticercose, criados em isolamento no Departamento de Veterinária da UFV, sob alimentação controlada desde o nascimento e mais 55 soros de bovinos considerados negativos na rotina de inspeção *post-mortem*. Também foram estudadas eventuais reações cruzadas frente a 10 soros de bovinos portadores de actinomicose (n=2), actinobacilose (n=1), fasciolose (n=1) diagnosticados na rotina de inspeção *post-mortem* em matadouro e de bovinos infectados experimentalmente com *Anaplasma marginale* (n=3), *Babesia sp.* (n=2) e infecção mista por *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* (n=1). O exame *post-mortem* se baseou na técnica estabelecida na “Rotina Oficial nas Linhas de Inspeção e Inspeção Final” do SIF (Brasil, 1971), considerando o minucioso exame em sítios de eleição da cisticercose, como, língua, coração, músculos da mastigação e da carcaça, conforme recomendações de Santos (1975), ainda atendendo às sugestões de Santos (1993).

3.2. Preparo dos antígenos empregados no teste ELISA

Os antígenos foram preparados conforme metodologia utilizada por Pinto et al. (2000), com algumas modificações. Diante da dificuldade de obtenção de cisticercos de *T. saginata* em quantidade suficiente, não foi possível o preparo de antígenos homólogos para serem avaliados na presente pesquisa.

3.2.1. Antígenos de larva de *T. crassiceps* (*Cysticercus longicollis*)

Os parasitas foram mantidos por infecção experimental com inoculação intraperitoneal de cinco a dez parasitas, formas pequenas sem brotamentos visíveis, em camundongos fêmeas BALB/c de 8-12 semanas, com auxílio de agulha de calibre 25x7 e cerca de 0,2ml de solução salina 0,15M. Após 90 dias, os animais com aumento do volume abdominal foram sacrificados e os parasitas então retirados cuidadosamente da cavidade peritoneal. Cisticercos em fase de degeneração ou calcificação foram eliminados e os demais foram utilizados em seguida no preparo dos antígenos para evitar ruptura das vesículas.

3.2.1.1. Antígeno total de larva de *T. crassiceps*

As seguintes etapas constituíram o preparo do antígeno total de larva de *T. crassiceps*:

- desidratação “overnight” dos cisticercos por liofilização;
- trituração dos cisticercos desidratados em gral;
- adição de solução salina 0,15M obtendo uma proporção final de 6,5 a 10% (pó);
- homogeneização em homogeneizador de tecido tipo Potter, em banho de gelo;
- centrifugação a 17.400g/30min/4°C;
- separação do sobrenadante para uso como antígeno;
- adição de inibidor de protease PMSF (0,25M – 10µl/ml);
- estocagem a -20°C

3.2.1.2. Antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*

As seguintes etapas se constituíram do preparo do antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*:

- centrifugação dos cisticercos a 35.000g/30min/4°C;
- separação do sobrenadante para uso;
- adição de inibidor de protease PMSF (0,25M – 10µl/ml);
- estocagem a -20°C.

3.2.2. Antígenos de larva de *T. solium* (*Cysticercus cellulosae*)

3.2.2.1. Antígeno total de larva de *T. solium*

Os cisticercos foram obtidos da musculatura de suíno naturalmente infectado, procedente de região endêmica. Com o auxílio de um bisturi, separou-se os cisticercos da musculatura do animal, tendo-se o cuidado de mantê-los íntegros. Após congelamento do material obtido, as seguintes etapas foram realizadas:

- desidratação “overnight” dos cisticercos por liofilização;
- trituração dos cisticercos desidratados em gral;
- adição de solução salina 0,15M obtendo uma proporção final de 6,5 a 10% (pó);
- homogeneização em homogeneizador de tecido tipo Potter, em banho de gelo;
- centrifugação a 17.400g/30min/4°C;
- separação do sobrenadante para uso como antígeno;
- adição de inibidor de protease PMSF (0,25M – 10µl/ml);
- estocagem a -20°C.

3.2.2.2. Antígeno de escólex de larva de *T. solium*

Após a obtenção dos cisticercos a partir da musculatura de suíno com infecção natural, removeu-se a membrana do cisto e o escólex foi congelado para posterior processamento, que consistiu em:

- desidratação “overnight” dos escólex por liofilização;
- trituração dos escólex desidratados em gral;
- adição de solução salina 0,15M obtendo uma proporção final de 6,5 a 10% (pó);
- homogeneização em homogeneizador de tecido tipo Potter, em banho de gelo;
- centrifugação a 17.400g/30min/4°C;
- separação do sobrenadante para uso como antígeno;
- adição de inibidor de protease PMSF (0,25M – 10µl/ml);
- estocagem a -20°C.

3.2.2.3. Antígeno de membrana de larva de *T. solium*

As membranas separadas dos cisticercos foram submetidas a congelamento para serem posteriormente processadas para a obtenção do antígeno respectivo através das seguintes etapas:

- desidratação “overnight” das membranas por liofilização;
- trituração das membranas desidratadas em gral;
- adição de solução salina 0,15M obtendo uma proporção final de 6,5 a 10% (pó);
- homogeneização em homogeneizador de tecido tipo Potter, em banho de gelo;
- centrifugação a 17.400g/30min/4°C;
- separação do sobrenadante para uso como antígeno;
- adição de inibidor de protease PMSF (0,25M – 10µl/ml);
- estocagem a -20°C.

3.3. Caracterização dos antígenos

3.3.1. Dosagem de proteínas

Foi realizada a dosagem protéica utilizando o ácido bicinconínico, conforme metodologia descrita por Smith et al. (1985).

3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os componentes dos antígenos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições redutoras na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970), e por Studier (1973). Foi utilizado o gel de separação em gradiente de 5 a 20%, obtido em sistema de vasos comunicantes, e gel a 5% para o empilhamento. O gel de separação foi preparado em solução tamponada Tris (hidroximetilaminoetano)-HCl 1,5M pH 8,8 e o gel de empilhamento em Tris-HCl 0,5M pH 6,8, ambas contendo 0,025% de SDS. Foram utilizadas placas de vidro de 14,5x16,5cm e espaçadores de 1mm de espessura.

As corridas eletroforéticas em solução-tampão de corrida (Trizma 25mM; glicina 192mM; SDS 0,1%; pH 8,3) foram iniciadas a 50V (cerca de 15mA) até o empilhamento das amostras no início do gel de separação, quando a voltagem foi aumentada e mantida a 100V (cerca de 30mA), até a chegada do marcador azul de bromofenol no final do gel.

Após a corrida eletroforética os géis foram fixados por 30 minutos em metanol a 40% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) em água e corados por 10 minutos a 56°C em azul brilhante de Comassie R-250 a 0,1%, metanol a 45% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) em água e descorados por três trocas de 10 minutos em ácido acético a 7% (v/v) em banho-maria a 56°C.

Os antígenos, cerca de 20µg por mm, foram diluídos (v/v) em solução-tampão de amostra (Trizma 60mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 25%; 2-mercaptoetanol 14,4 mM e azul de bromofenol 0,1%), e submetidos a aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos, imediatamente antes da aplicação.

Foram utilizados marcadores de massa molecular (MM) 6,5 kD a 205 kD, M4038 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) submetidos a igual tratamento, exceto o aquecimento, que se restringiu a 1 minuto.

3.4. ELISA

3.4.1. Técnica básica

Baseando-se nos testes realizados por Pinto et al. (2000), as placas de poliestireno foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6 estocadas a 37°C durante 1 hora. Após três lavagens, de cinco minutos cada uma, em solução salina contendo 0,05% de tween-20, foi realizado o bloqueio dos sítios reativos (leite desnatado a 5% em PBS pH 7,4), durante 1 hora a 37°C. Novas lavagens foram realizadas e as amostras foram diluídas em leite desnatado a 1% em PBS pH 7,4 e a placa incubada por 30 minutos a 37°C. Após lavagens, foi adicionado o conjugado, anti-IgG de bovino marcada com peroxidase A5295 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) e repetidos os procedimentos de incubação e lavagem. A reação foi revelada com solução de dihidroclorato de o-fenilendiamina (OPD) P8287 (Sigma Chemical Co.; St Louis, MO, USA) a 0,1% e H₂O₂ 0,003% em tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, durante um período de incubação de 10 minutos. A reação foi bloqueada com H₂SO₄ 4N. As leituras foram

realizadas em espectrofotômetro próprio a 492nm. A quantidade de reagentes aplicados à placa se manteve em 100µl, exceto para a solução bloqueadora, 200µl.

3.4.2. Padronização

A padronização foi realizada em duas etapas.

No início dos testes de padronização, os períodos de incubação e a condição de bloqueio dos sítios reativos das placas foram fixados, por convenção, baseando-se na seleção prévia feita por Pinto et al. (2000), no diagnóstico da cisticercose suína.

A primeira etapa de padronização foi dividida em quatro fases, quando se avaliaram o tipo de substância bloqueadora, marca de placa e a titulação em bloco de antígeno, soro e conjugado, para definir as melhores concentrações ou diluições seriadas dos mesmos, considerando os diferentes antígenos. Cada fase se caracterizou pela avaliação simultânea de dois ou mais tipos de parâmetros, através de titulação em bloco, conforme apêndice 7.1. Os melhores parâmetros foram definidos por critério baseado na maior amplitude da diferença entre a média das densidades ópticas (D.O.) de dois soros-controle positivos oriundos de animais infectados experimentalmente e a média das D.O. de dois, quatro ou seis soros-controle negativos de animais criados em isolamento. Definidos os melhores parâmetros nesta etapa, foi comparado na sua última fase, o desempenho dos cinco antígenos, cada um em sua melhor condição analítica, estabelecida nas três primeiras fases.

Na fase 1, avaliou-se a melhor concentração de antígeno, as quatro melhores diluições de soro e a melhor marca de placa, entre as duas testadas¹. As concentrações de antígeno testadas foram 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 µg por orifício da placa. Empregaram-se dois soros-controle positivos e dois soros-controle negativos em diluições seriadas (duas vezes), variando de 1:25 a 1:3200, conforme apêndice 7.1.1. Nesta fase, o conjugado foi utilizado na diluição 1:5.000.

Na fase 2, foi realizada a avaliação do conjugado, partindo das melhores combinações de concentração de antígeno, marca de placa e diluições de soro verificados na fase 1. Foram empregados dois soros-controle positivos e quatro soros-controle negativos e as seguintes diluições seriadas (duas vezes) de conjugado: 1:625, 1:1.250, 1:2.500, 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000, conforme apêndice 7.1.2.

¹ Marca 1: Kartell®, Byosystems Com. Imp. e Exp. de Equipamentos para laboratórios Ltda, Curitiba-PR.
Marca 2: Cral®, SL Suprimentos Laboratoriais Ltda, Belo Horizonte-MG.

Na fase 3, avaliou-se o tipo de substância de bloqueio: gelatina², albumina bovina³ e leite desnatado⁴. O teste foi realizado com as melhores condições do antígeno, soros e conjugado, conforme avaliado anteriormente. Empregaram-se dois soros-controle positivos e seis soros-controle negativos, conforme apêndice 7.1.3.

Na fase 4, foram comparados os cinco antígenos nas situações que proporcionaram os melhores resultados nas fases anteriores, conforme apêndice 7.1.4.

Na etapa final, os antígenos foram ensaiados cada um em suas melhores condições experimentais frente a todos os soros positivos (80), negativos (60) e de outras patologias (10). Os soros foram analisados em triplicata, desprezando-se o valor discrepante e calculando a média dos outros dois. Devido à grande sensibilidade do teste ELISA a diversos fatores que interferem nos resultados finais, como pequenas diferenças de diluições, condições de temperatura e umidade relativa e, principalmente, uso de várias amostras, os valores obtidos foram ajustados para uma placa padrão. O fator de correção foi calculado conforme determinado por Passos (1993), através da fórmula:

$$\text{Fator (F)} = \frac{Po - No}{Pt - Nt}$$

$$\text{Valor ajustado} = F (St - Nt) + No$$

Sendo:

Po: média dos controles positivos na placa padrão

No: média dos controles negativos na placa padrão

Pt: média dos controles positivos na placa teste

Nt: média dos controles negativos na placa teste

St: média da amostra testada

3.4.3. Determinação dos pontos de corte

Visando a definição da positividade e negatividade dos soros analisados na segunda etapa de padronização do teste ELISA, foram determinados os pontos de corte, representados pela soma da D.O. média obtida em análise dos soros-controle negativos mais dois desvios-padrão. O ponto de corte 1 foi calculado a partir da D.O. média obtida em análise dos soros

² Gelatina G-9382, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

³ Albumina Bovina A-7030, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

⁴ Leite desnatado em pó Molico®, Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil.

negativos de animais criados em isolamento juntamente com soros de animais considerados negativos à inspeção *post-mortem*. O ponto de corte 2 foi calculado utilizando a D.O. média obtida apenas com os soros obtidos de animais criados em isolamento.

3.4.4. Análise estatística

Na primeira etapa de padronização, os resultados foram processados e analisados através do programa de análises estatísticas, SAEG (1999). Os valores a serem analisados foram, primeiramente, submetidos aos testes de Cochran e Barlett, para verificar se apresentavam homocedasticidade. Em sequência, procedeu-se à análise de variância (ANOVA) quantitativa das diferenças de D.O. entre dois soros-controle positivos e dois, quatro ou seis soros-controle negativos obtidas em cada fase. Parâmetros que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) foram testados através de teste de comparação de médias (Tukey), ao nível de 95% de probabilidade, visando determinar o melhor deles, ou seja, aquele que propiciava maior diferenciação entre soros-controle positivos e negativos. Nos casos em que os valores a serem analisados não apresentaram homocedasticidade, foi realizada análise de variância não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) e comparações múltiplas dos mesmos.

Na segunda etapa, testou-se cada antígeno em suas melhores condições definidas na etapa anterior frente a todos os soros-controle discriminados na amostragem. Os resultados de D.O. obtidos com cada antígeno foram corrigidos para uma placa padrão, utilizando a fórmula descrita no item 3.4.2. O desempenho dos antígenos foi determinado pela taxas de sensibilidade e especificidade, a partir dos dados organizados em tabelas de contingência (4X2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos antígenos

Os antígenos empregados na pesquisa foram caracterizados pela sua concentração de proteína, obtida pelo método do ácido bicinonínico (Tabela 1) e pela determinação dos respectivos peptídeos, através de eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 2 e Tabela 2).

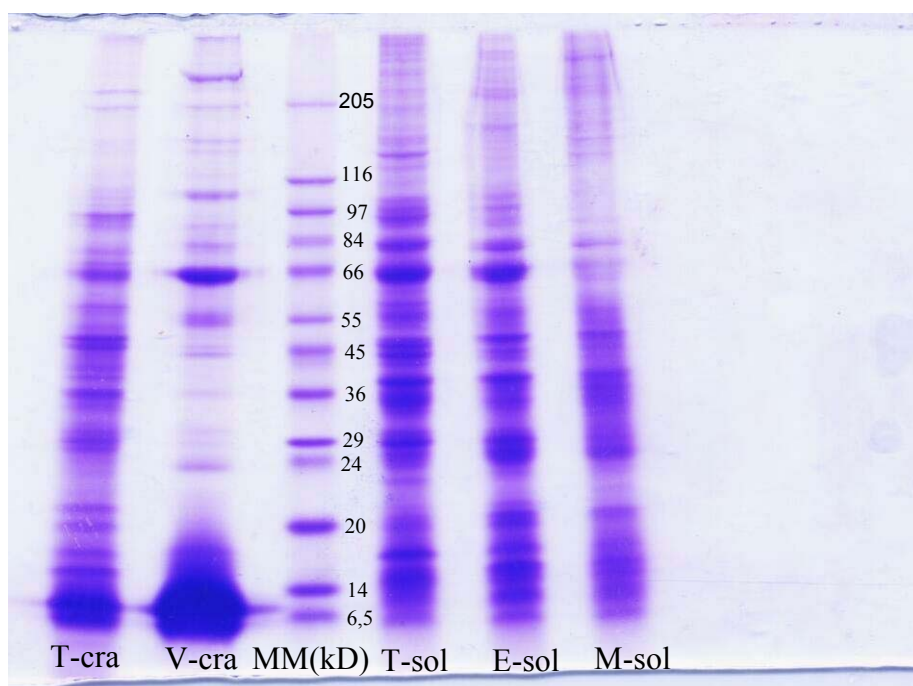


Figura 2. Representação peptídica dos antígenos total (T-cra) e vesicular (V-cra) de larva de *T. crassiceps* e total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de *T. solium* e marcador molecular (MM) Sigma M 4038 em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob gradiente 5 a 20%.

Todos os antígenos mostraram um número elevado de peptídeos. Foram identificados 25 peptídeos no antígeno total de larva de *T. crassiceps*, 18 no antígeno de líquido vesicular

de larva de *T. crassiceps*, 31 no total de larva de *T. solium*, 30 no antígeno de escólex de larva de *T. solium* e 23 no antígeno de membrana de larva de *T. solium* (Tabela 2).

De modo geral, os antígenos mostraram uma grande variação nos tipos de peptídeos. Os diferentes antígenos também compartilharam peptídeos comuns, como os de 66, 13 e 6,2-6,3 kD, que participaram dos cinco antígenos estudados e podem estar relacionados entre os principais peptídeos específicos para diagnóstico da cisticercose. Daí sugerem-se pesquisas adicionais para esclarecimento desta relação, utilizando métodos mais apropriados para esta finalidade, como o Imunoblot.

No Imunoblot, Hayunga et al. (1991a) observaram que uma banda peptídica menor que 12 kD do antígeno ThFAS reagiu especificamente com soros de animais infectados experimentalmente com ovos de *T. saginata*. Os mesmos autores constataram a presença de um peptídeo de massa equivalente em antígenos vesiculares de larva de *T. crassiceps* e de *T. taeniaeformis*, o qual mostrou-se antigenicamente similar ao mencionado peptídeo do antígeno ThFAS. O referido peptídeo também ficou evidenciado na caracterização antigênica da presente pesquisa, cuja massa molecular foi calculada em 13 kD. Este achado reforça a necessidade de outras pesquisas que possam explorar o potencial diagnóstico de antígenos heterólogos, como os de *T. crassiceps*.

Observou-se uma nítida redução no número de peptídeos de baixa massa molecular no antígeno vesicular de larva de *T. crassiceps*. Verificou-se ainda a presença expressiva de peptídeos de alta massa molecular nos antígenos total e de escólex de larva de *T. solium*. Tais variações podem refletir no resultado do desempenho do teste ELISA para diagnóstico da cisticercose bovina. Entretanto, outras pesquisas são necessárias para esclarecer tal hipótese.

Dois peptídeos de baixa massa molecular, 13 e 6,2-6,3 kD, se destacaram entre os antígenos de larva de *T. crassiceps*, mostrando inclusive um perfil especial de bandas, mais densas, na eletroforese sob gradiente de 5 a 20%. Sugere-se, assim, que tais peptídeos também sejam considerados em estudos adicionais para uma melhor elucidação da sua participação em reações imunológicas nos testes diagnósticos.

O menor número de peptídeos no antígeno vesicular de *T. crassiceps* também coincidiu com a sua menor concentração protéica, conforme observado na dosagem de proteínas (Tabela 1).

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos na determinação da concentração protéica dos antígenos. As amostras foram diluídas a 1:25. A concentração protéica expressa em

$\mu\text{g/mL}$ refere-se à concentração das amostras nesta diluição, enquanto a concentração protéica final refere-se à concentração das amostras não diluídas.

Tabela 1. Absorvância (562 nm) e concentração protéica ($\mu\text{g/mL}$) dos antígenos total e vesicular de larva de *T. crassiceps* (T-cra) e antígenos total, de escólex e de membrana de larva de *T. solium* (T-sol) determinada através de dosagem de proteínas utilizando o método do ácido bicinconínico.

Antígenos	Absorvância	Concentração protéica	Concentração protéica final
Total T-cra	0,452	181,5	4.537,5
Vesicular T-cra	0,156	61,3	1.533,0
Total T-sol	0,656	264,4	6.610,0
Escólex T-sol	0,421	168,9	4.222,5
Membrana T-sol	0,650	261,9	6.547,5

As massas moleculares dos peptídeos para cada um dos cinco antígenos estão representadas na tabela 2.

Tabela 2. Caracterização dos antígenos total e vesicular de larva de *T. crassiceps* (T-cra) e total, de escólex e de membrana de larva de *T. solium* (T-sol) pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o tipo de peptídeo.

Ordem de Identificação dos peptídeos	Massa (kD) dos peptídeos	Antígenos*				
		Total T-cra	Vesicular T-cra	Total T-sol	Escólex T-sol	Membrana T-sol
1	250	-	-	X	X	-
2	245	-	-	-	X	X
3	240	-	-	X	X	-
4	230	-	-	X	X	-
5	220-225	-	X	-	-	-
6	215-220	X	-	-	-	-
7	210-215	-	-	X	X	X
8	208	-	-	-	X	X
9	205	X	X	-	-	-
10	200	-	-	X	-	-
11	155	-	-	-	-	X
12	150	-	-	X	X	X
13	145-150	X	X	-	-	-
14	145	-	-	X	-	-
15	140	X	X	-	X	X
16	130	-	-	X	X	-
17	120	-	-	X	-	X
18	110	-	X	X	-	-
19	105	X	-	-	-	-
20	100	X	-	X	X	-

Tabela 2. Caracterização dos antígenos total e vesicular de larva de *T. crassiceps* (T-cra) e total, de escólex e de membrana de larva de *T. solium* (T-sol) pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o tipo de peptídeo (continuação).

Ordem de Identificação dos peptídeos	Massa (kD) dos peptídeos	Antígenos*				
		Total T-cra	Vesicular T-cra	Total T-sol	Escólex T-sol	Membrana T-sol
21	97-98	X	-	X	X	-
22	94	-	-	X	-	-
23	89-92	X	X	-	X	X
24	83	-	X	X	X	X
25	73-72	X	-	-	-	-
26	66	X	X	X	X	X
27	64	-	-	-	-	X
28	58-62	X	-	X	X	X
29	55	-	X	-	-	-
30	54	-	-	X	X	-
31	47-50	X	-	X	X	X
32	45	-	X	-	-	X
33	43-44	X	-	X	X	-
34	42	-	X	-	X	-
35	41	X	-	-	-	-
36	39	X	-	X	X	X
37	36-37	X	X	X	-	-
38	34	X	-	-	X	X
39	31-32	-	X	X	X	X
40	29-30	X	X	-	-	-
41	27-28	X	-	X	-	-
42	24-25	-	-	X	X	X
43	23	-	X	X	-	-
44	22	-	-	-	X	-
45	21	X	-	X	X	X
46	20	X	-	X	X	-
47	18	-	X	-	-	-
48	16	X	-	X	X	X
49	15	X	-	X	X	X
50	13	X	X	X	X	X
51	6,2-6,3	X	X	X	X	X

NOTA: Em cada uma das colunas “X” indica a presença de peptídeo, enquanto “-” indica a ausência do mesmo.

* T-cra = *Taenia crassiceps* ; T-sol = *Taenia solium*

4.2. Padronização: primeira etapa

4.2.1. Antígeno total de larva de *T. crassiceps*

Analisando o antígeno total de larva de *T. crassiceps* quanto à variação de sua concentração, da diluição dos soros e do conjugado, da marca de placa e do tipo de substância bloqueadora foram observados os resultados mostrados nas tabelas 3, 4, 5, 6 e 7, distribuídos nas próximas três fases, conforme se segue.

Fase 1. Avaliação das concentrações do antígeno, diluições dos soros e marcas de placa.

Tabela 3. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno total de larva de *T. crassiceps* e diluições de soros.

Concentrações de antígeno (µg/orifício)	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
0,25	0,151 ^a	0,089 ^a	0,076 ^a	0,089 ^a
0,5	0,195 ^{a,b}	0,202 ^b	0,157 ^{b,c}	0,154 ^{a,b}
1	0,277 ^{b,c}	0,225 ^{b,c}	0,209 ^{b,c}	0,161 ^{a,b}
2	0,258 ^{b,c}	0,278 ^c	0,233 ^{b,d}	0,211 ^{a,b}
4	0,302 ^c	0,289 ^c	0,287 ^d	0,253 ^b

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Na maioria das vezes, as concentrações de 2 µg/orifício e 4 µg/orifício de antígeno total de larva de *T. crassiceps* propiciaram valores mais elevados de média de diferença de D.O. entre soros positivos e negativos. No entanto, optou-se pela escolha da concentração de 1 µg/orifício para utilização na avaliação de marcas de placa e nas fases seguintes, pois não houve diferença estatística entre essas três concentrações, que mostraram melhor desempenho, nesta fase e em ensaios preliminares; além de permitir uma economia de antígeno.

Como as diluições de 1:25 a 1:200 sempre apresentaram maior amplitude da diferença entre as médias de D.O. de soros positivos e negativos na fase 1, apenas os dados referentes a essas diluições são explicitados nos resultados desta fase e das demais, embora as diluições de 1:400 a 1:3.2000 também tenham sido testadas nesta fase. Este comportamento foi verificado na análise subsequente de todos os antígenos, por isso tal procedimento foi adotado em toda a primeira etapa da padronização.

Tabela 4. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno total de larva de *T. crassiceps*.

Diluições dos soros	Concentrações de antígeno ($\mu\text{g/orifício}$)				
	0,25 ⁽¹⁾	0,5 ⁽¹⁾	1 ⁽¹⁾	2 ⁽¹⁾	4 ⁽¹⁾
1:25	0,151 ^a	0,195 ^a	0,277 ^a	0,258 ^a	0,302 ^a
1:50	0,089 ^{a,b}	0,202 ^a	0,225 ^{a,b}	0,278 ^a	0,289 ^{a,b}
1:100	0,076 ^{a,b}	0,157 ^{a,b}	0,209 ^{a,b}	0,233 ^{a,b}	0,287 ^{a,b}
1:200	0,089 ^{a,b}	0,154 ^{a,b}	0,161 ^b	0,211 ^{a,b}	0,253 ^{a,b}

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

As diluições de 1:25 a 1:200 foram semelhantes estatisticamente, embora a diluição 1:25 tenha garantido, na maioria das vezes, o maior valor médio da diferença de D.O. entre soros-controle positivos e negativos

Tabela 5. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno total de larva de *T. crassiceps*.

Marcas de placas	Média da diferença de D.O. ⁽¹⁾
Marca 1	0,172
Marca 2	0,162

NOTA: (1) A ausência de letras na análise da coluna significa que não houve diferença significativa entre as marcas na análise de variância ($p>0,05$).

Ao analisar os resultados das quatro diluições de soro em conjunto, verificou-se que não houve diferença estatística entre as marcas de placas testadas.

Fase 2. Avaliação do conjugado.

Tabela 6. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno total de larva de *T. crassiceps*.

Diluições de conjugado	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
1:625	0,033 ^{a,d}	0,065 ^a	0,120 ^{a,c}	0,116 ^{a,c,d}
1:1.250	0,085 ^{a,c}	0,153 ^{a,b}	0,239 ^a	0,156 ^{a,c}
1:2.500	0,187 ^{b,c}	0,222 ^b	0,245 ^a	0,199 ^a
1:5.000	0,247 ^b	0,216 ^b	0,119 ^{a,d}	0,107 ^{a,c,d}
1:10.000	0,117 ^{b,c,d}	0,087 ^{a,b}	0,062 ^{b,c,d}	0,040 ^{b,c}
1:20.000	0,056 ^{a,d}	0,043 ^a	0,035 ^{b,c,d}	0,021 ^{b,d}
1:40.000	0,016 ^{a,d}	0,013 ^a	0,007 ^{b,d}	0,002 ^b

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

Observou-se que as diluições 1:1.250, 1:2.500 e 1:5.000 mostraram maior amplitude da diferença entre as médias de D.O. de soros positivos e negativos. Embora as duas primeiras diluições mencionadas tenham apresentado elevados valores de média na metade das diluições de soro, preferiu-se adotar a diluição 1:5.000 no prosseguimento da padronização, em função da redução do custo da técnica quanto ao consumo de conjugado, um dos reagentes mais caros. Apesar da diluição 1:5.000 ter sido estatisticamente semelhante à diluição 1:10.000, a anterior foi preferida por ter proporcionado maiores valores de média da diferença entre soros-controle positivos e negativos.

Fase 3. Avaliação do tipo de substância bloqueadora.

Tabela 7. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras e diluições de soros para o antígeno total de larva de *T. crassiceps*.

Substâncias bloqueadoras	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽²⁾	1:100 ⁽²⁾	1:200 ⁽²⁾
Leite Desnatado	0,242 ^a	0,213 ^a	0,114 ^a	0,007 ^a
Albumina	0,038 ^b	0,050 ^b	0,038 ^a	0,012 ^a
Gelatina	- 0,090 ^c	- 0,044 ^c	- 0,067 ^b	-0,068 ^b

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

(2) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

Com o uso da gelatina, verificou-se um pior desempenho do teste ELISA, demonstrado por D.O. mais elevadas dos soros negativos que as dos soros positivos, o que resultou em valores negativos de média da diferença entre esses dois grupos de soros. O leite desnatado foi a substância bloqueadora com desempenho estatisticamente superior, na metade das diluições analisadas (1:25 e 1:50), em relação à albumina. Na outra metade das diluições (1:100 e 1:200), apesar de ter apresentado semelhança estatística com a albumina, o leite desnatado apresentou também maior valor de amplitude da diferença entre as médias de D.O. de soros positivos e negativos para a diluição 1:100.

4.2.2. Antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*

Analisando o antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps* quanto à variação de sua concentração, da diluição dos soros e do conjugado, da marca de placa e do tipo de substância bloqueadora foram observados os resultados mostrados nas tabelas 8, 9, 10, 11 e 12 distribuídos nas próximas três fases, conforme se segue.

Fase 1. Avaliação das concentrações do antígeno, diluições dos soros e marcas de placa.

Tabela 8. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps* e diluições de soros.

Concentrações de antígeno (µg/ orifício)	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽²⁾
0,25	0,018 ^a	0,039 ^a	0,016 ^a	0,018 ^a
0,5	0,095 ^b	0,089 ^{a,b}	0,080 ^{a,b}	0,048 ^{a,b}
1	0,137 ^{b,c}	0,096 ^{a,b}	0,079 ^{a,b}	0,099 ^{a,b}
2	0,147 ^{b,c}	0,155 ^b	0,098 ^{a,b}	0,066 ^{a,b}
4	0,185 ^c	0,148 ^b	0,190 ^c	0,202 ^b

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

(2) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Na análise da tabela 8, nota-se que os valores de média obtidos com a concentração de 4 µg de antígeno por orifício, nas diluições de soro 1:100 e 1:200, se desviam de uma

tendência de decréscimo observada para as outras concentrações de antígeno à medida que a diluição dos soros aumenta. Tal fato pode ser, possivelmente, decorrente de erro durante a execução do teste ELISA, que mostrou valores subestimados de D.O. na reação dos soros negativos, aumentando a diferença entre positivos e negativos.

A concentração de 1 µg/orifício não apresentou diferença estatística em relação às concentrações maiores (2 e 4 µg/orifício), que esboçaram melhor desempenho. Apesar da referida concentração ter sido estatisticamente semelhante a concentrações menores em algumas diluições de soro, esta foi a escolhida nos testes seguintes por ter garantido maiores valores de médias entre soros-controle positivos e negativos. No decorrer dos testes com os demais antígenos estudados, percebeu-se que a concentração de 1 µg de antígeno por orifício sempre configurou como a melhor, sendo a escolhida para prosseguir a padronização.

Tabela 9. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*.

Diluições dos soros	Concentrações de antígeno (µg/orifício)				
	0,25 ⁽¹⁾	0,5 ⁽²⁾	1 ⁽¹⁾	2 ⁽²⁾	4 ⁽²⁾
1:25	0,018	0,095 ^a	0,137	0,147 ^a	0,185 ^a
1:50	0,039	0,089 ^{a,b}	0,096	0,155 ^a	0,148 ^a
1:100	0,016	0,080 ^{a,b,c}	0,079	0,098 ^{a,b}	0,190 ^a
1:200	0,018	0,048 ^{a,b,c}	0,099	0,066 ^b	0,202 ^a

NOTA: (1) A ausência de letras na análise da coluna significa que não houve diferença significativa entre as diluições de soros na análise de variância ($p > 0,05$).

(2) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Apesar de praticamente não ter se diferenciado estatisticamente das maiores diluições, a diluição 1:25 se destacou das demais por ter proporcionado, na maioria das vezes, maiores valores de média da diferença entre soros-controle positivos e negativos.

Tabela 10. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*.

Marcas de placas	Média da diferença de D.O. ⁽¹⁾
Marca 1	0,074
Marca 2	0,106

NOTA: (1) A ausência de letras na análise da coluna significa que não houve diferença significativa entre as marcas na análise de variância ($p > 0,05$).

Não houve diferença significativa entre as marcas de placas, embora a marca 2 tenha mostrado valor superior.

Fase 2. Avaliação do conjugado.

Tabela 11. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*.

Diluições de conjugado	Diluições de soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
1:625	0,041 ^{a,b}	0,047 ^a	0,010	-0,061 ^a
1:1.250	0,087 ^{a,c}	0,110 ^{a,c}	0,069	0,060 ^{a,b}
1:2.500	0,191 ^c	0,123 ^a	0,061	0,085 ^b
1:5.000	0,176 ^c	0,060 ^{a,c,d}	0,041	0,008 ^{a,b}
1:10.000	0,085 ^{a,c}	0,068 ^{a,c,d}	0,038	0,012 ^{a,b}
1:20.000	0,047 ^{a,b}	0,024 ^{b,c}	0,017	0,013 ^{a,b}
1:40.000	0,030 ^{a,b}	0,010 ^{b,d}	0,004	-0,001 ^a

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Observou-se nesta fase uma nítida superioridade das reações diferenciais entre soros positivos e negativos, quando se testaram as diluições de soro 1:25 e 1:50, em relação às outras duas (Tabela 11).

Portanto, ao analisar os resultados das diluições de soro 1:25 e 1:50, observou-se que a diluição de conjugado a 1:2.500 foi a que apresentou melhor desempenho devido às maiores médias apresentadas.

Fase 3. Avaliação do tipo de substância bloqueadora.

Tabela 12. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras e diluições de soros para o antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*.

Substâncias bloqueadoras	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽²⁾	1:200 ⁽²⁾
Leite desnatado	0,102 ^a	0,048 ^{a,b}	0,021	0,023
Albumina	0,096 ^a	0,069 ^a	0,014	0,011
Gelatina	0,010 ^b	0,014 ^b	0,001	-0,010

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

(2) A ausência de letras, na mesma coluna, significa que não houve diferença significativa entre as substâncias bloqueadoras na análise de variância ($p>0,05$).

Similarmente ao antígeno total de larva de *T. crassiceps*, o leite desnatado foi a melhor substância de bloqueio, enquanto que a gelatina foi a pior.

4.2.3. Antígeno total de larva de *T. solium*

Analisando o antígeno total de larva de *T. solium* quanto à variação de sua concentração, da diluição dos soros e do conjugado, da marca de placa e do tipo de substância bloqueadora foram observados os resultados mostrados nas tabelas 13, 14, 15, 16 e 17, distribuídos nas próximas três fases, conforme se segue.

Fase 1. Avaliação das concentrações do antígeno, diluições dos soros e marcas de placa.

Tabela 13. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno total de larva de *T. solium* e diluições de soros.

Concentrações de antígeno ($\mu\text{g/orifício}$)	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
0,25	0,001 ^a	0,006 ^a	0,008 ^a	0,006 ^a
0,5	0,201 ^b	0,217 ^b	0,197 ^b	0,160 ^b
1	0,248 ^b	0,232 ^b	0,238 ^b	0,234 ^b
2	0,163 ^b	0,246 ^b	0,307 ^b	0,301 ^b
4	0,221 ^b	0,271 ^b	0,307 ^b	0,302 ^b

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

A concentração de 1 µg/orifício foi a escolhida para seguir a padronização, pois não se diferenciou estatisticamente das concentrações maiores e segue uma tendência de bom desempenho verificada na análise dos antígenos anteriores, além de revelar os valores mais elevados da amplitude da diferença entre soros positivos e negativos, particularmente sobre as concentrações mais econômicas (0,25 e 0,5 µg/orifício).

Tabela 14. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno total de larva de *T. solium*.

Diluições dos soros	Concentrações de antígeno (µg/orifício)				
	0,25 ⁽¹⁾	0,5 ⁽¹⁾	1 ⁽¹⁾	2 ⁽¹⁾	4 ⁽¹⁾
1:25	0,001	0,201 ^a	0,248 ^a	0,163 ^a	0,201 ^a
1:50	0,006	0,217 ^a	0,232 ^a	0,246 ^{a,b}	0,217 ^a
1:100	0,008	0,197 ^a	0,238 ^a	0,307 ^b	0,197 ^a
1:200	0,006	0,160 ^a	0,234 ^a	0,301 ^b	0,160 ^a

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

Todas as diluições de soro apresentaram resultados elevados e estatisticamente semelhantes, exceto quando combinadas com a concentração de 0,25 µg de antígeno por orifício.

Tabela 15. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno total de larva de *T. solium*.

Marcas de placas	Média da diferença de D.O. ⁽¹⁾
Marca 1	0,156
Marca 2	0,176

NOTA: (1) A ausência de letras na análise da coluna significa que não houve diferença significativa entre as marcas na análise de variância ($p>0,05$).

Novamente, não se observou diferença estatística entre o desempenho das duas marcas de placas.

Fase 2. Avaliação do conjugado.

Tabela 16. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno total de larva de *T. solium*.

Diluições de conjugado	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
1:625	0,079 ^{a,d}	0,112 ^{a,c}	0,093 ^{a,d,e}	0,055 ^{a,c}
1:1.250	0,131 ^{b,c,d}	0,220 ^{b,c}	0,172 ^{a,c}	0,175 ^b
1:2.500	0,207 ^{b,c}	0,252 ^b	0,230 ^a	0,250 ^b
1:5.000	0,253 ^b	0,200 ^{b,c}	0,164 ^{a,c,d}	0,113 ^{b,c,d}
1:10.000	0,101 ^{a,c}	0,118 ^{b,c,d}	0,066 ^{b,c,d}	0,056 ^{a,c}
1:20.000	0,101 ^{b,d}	0,065 ^{a,d}	0,058 ^{b,d}	0,050 ^{b,c,e}
1:40.000	0,053 ^{a,d}	0,030 ^{a,d}	0,039 ^{b,e}	0,012 ^{a,d,e}

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

As diluições 1:1.250, 1:2.500 e 1:5.000 foram as que apresentaram os melhores resultados. Apesar de ter proporcionado, em algumas situações, médias menores que as das duas diluições anteriores, optou-se pela diluição 1:5.000 para prosseguir a padronização porque não houve diferença estatística entre os resultados dessas três diluições, e o seu uso permite maior economia de reagente.

Fase 3. Avaliação do tipo de substância bloqueadora.

Tabela 17. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras e diluições de soros para o antígeno total de larva de *T. solium*.

Substâncias bloqueadoras	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
Leite desnatado	0,225 ^a	0,222 ^a	0,188 ^a	0,190 ^a
Albumina	0,122 ^a	0,097 ^b	0,075 ^b	0,073 ^b
Gelatina	0,013 ^b	0,056 ^b	0,085 ^b	0,106 ^b

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

Optou-se pelo leite desnatado a 5%, pois proporcionou valores elevados de média da diferença entre soros-controle positivos e negativos, inclusive diferenciando-se

estatisticamente das outras substâncias de bloqueio nas três maiores diluições de soros e da gelatina na menor.

4.2.4. Antígeno de escólex de larva de *T. solium*

Analisando o antígeno de escólex de larva de *T. solium* quanto à variação de sua concentração, da diluição dos soros e do conjugado, da marca de placa e do tipo de substância bloqueadora foram observados os resultados mostrados nas tabelas 18, 19, 20, 21 e 22, distribuídos nas próximas três fases, conforme se segue.

Fase 1. Avaliação das concentrações do antígeno, diluições dos soros e marcas de placa.

Tabela 18. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno de escólex de larva de *T. solium* e diluições de soros.

Concentrações de antígeno (µg/orifício)	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
0,25	0,191	0,126	0,095	0,077
0,5	0,180	0,179	0,131	0,138
1	0,224	0,219	0,165	0,153
2	0,214	0,242	0,229	0,215
4	0,178	0,170	0,147	0,107

NOTA: (1) A ausência de letras, na mesma coluna, significa que não houve diferença significativa entre as concentrações de antígeno na análise de variância ($p > 0,05$).

Como não houve diferença estatística entre as concentrações de antígeno testadas e as concentrações de 1 e 2 µg/orifício foram as que proporcionaram os valores mais elevados de média, optou-se pela concentração de 1 µg/orifício, pelo menor gasto de antígeno.

Tabela 19. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno de escólex de larva de *T. solium*.

Diluições dos soros	Concentrações de antígeno ($\mu\text{g/orificio}$)				
	0,25 ⁽¹⁾	0,5 ⁽²⁾	1 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	4 ⁽²⁾
1:25	0,191 ^a	0,180	0,224	0,214	0,178
1:50	0,126 ^a	0,179	0,219	0,242	0,170
1:100	0,095 ^a	0,131	0,165	0,229	0,147
1:200	0,077 ^a	0,138	0,153	0,215	0,107

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

(2) A ausência de letras, na mesma coluna, significa que não houve diferença significativa entre as diluições dos soros na análise de variância ($p>0,05$).

Não houve diferença estatística entre as diluições apresentadas, entretanto a diluição 1:25 foi a que proporcionou a maior diferenciação entre soros-controle positivos e negativos em todas as concentrações de antígeno, exceto na de 2 $\mu\text{g/orificio}$.

Tabela 20. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno de escólex de larva de *T. solium*.

Marcas de placas	Média da diferença de D.O. ⁽¹⁾
Marca 1	0,111
Marca 2	0,140

NOTA: (1) A ausência de letras na análise da coluna significa que não houve diferença significativa entre as marcas na análise de variância ($p>0,05$).

Não se observou diferença estatística entre o desempenho das duas marcas de placas testadas, embora a marca 2 tenha garantido maior diferenciação entre soros-controle positivos e negativos.

Fase 2. Avaliação do conjugado.

Tabela 21. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno de escólex de larva de *T. solium*.

Diluições de conjugado	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
1:625	0,075 ^{a,b}	0,110 ^{a,c}	0,122 ^{a,c,d}	0,122 ^{a,c,d}
1:1.250	0,160 ^{a,c}	0,211 ^a	0,236 ^a	0,188 ^{a,c}
1:2.500	0,259 ^c	0,242 ^a	0,231 ^{a,c}	0,215 ^a
1:5.000	0,247 ^c	0,220 ^a	0,156 ^{a,c,d}	0,120 ^{a,c,d}
1:10.000	0,068 ^{a,b}	0,071 ^{b,c}	0,060 ^{b,c}	0,049 ^{b,c}
1:20.000	0,051 ^{a,b}	0,041 ^{b,c}	0,032 ^{b,d}	0,041 ^{b,c}
1:40.000	0,022 ^b	0,023 ^b	0,022 ^b	0,015 ^{b,d}

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

As diluições de conjugado 1:1.250, 1:2.500 e 1:5.000 foram as que proporcionaram maiores valores para a amplitude da diferença entre soros-controle positivos e negativos. Para as duas menores diluições de soros, verificou-se que as três diluições de conjugado citadas foram as que proporcionaram maiores médias de diferença, inclusive estatisticamente superiores que as demais diluições de conjugado, na maioria das vezes. Novamente, optou-se por selecionar a diluição mais econômica, 1:5.000.

Fase 3. Avaliação do tipo de substância bloqueadora.

Tabela 22. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras para o antígeno de escólex de larva de *T. solium*.

Substâncias Bloqueadoras	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
Leite desnatado	0,257 ^a	0,176 ^a	0,150 ^a	0,124 ^a
Albumina	0,136 ^b	0,085 ^b	0,076 ^b	0,054 ^a
Gelatina	0,022 ^c	0,068 ^b	0,071 ^b	0,078 ^a

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Novamente, o leite desnatado se comportou melhor que a albumina e a gelatina em todas as situações, diferenciando-se estatisticamente dessas duas na maioria dos casos.

4.2.5. Antígeno de membrana de larva de *T. solium*

Analisando o antígeno de membrana de larva de *T. solium* quanto à variação de sua concentração, da diluição dos soros e do conjugado, da marca de placa e do tipo de substância bloqueadora foram observados os resultados mostrados nas tabelas 23, 24, 25, 26 e 27, distribuídos nas próximas três fases, conforme se segue.

Fase I. Avaliação das concentrações do antígeno, diluições dos soros e marcas de placa.

Tabela 23. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes concentrações do antígeno de membrana de larva de *T. solium* e diluições de soros.

Concentrações de antígeno (µg/orifício)	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽²⁾	1:200 ⁽²⁾
0,25	0,203	0,176	0,092 ^a	0,101 ^a
0,5	0,307	0,229	0,177 ^{a,b}	0,105 ^a
1	0,251	0,272	0,252 ^b	0,166 ^{a,b}
2	0,266	0,309	0,289 ^b	0,221 ^b
4	0,265	0,280	0,273 ^b	0,231 ^b

NOTA: (1) A ausência de letras, na mesma coluna, significa que não houve diferença significativa entre as concentrações de antígeno na análise de variância ($p>0,05$).

(2) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

Entre as menores concentrações de antígeno estudadas, a de 1 µg/orifício foi a única que não apresentou desempenho estatisticamente inferior às demais em todas as diluições de soros. Considerando este comportamento e a economia de antígeno, também se optou por esta concentração em fases e etapas posteriores de padronização.

Tabela 24. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de soros e concentrações do antígeno de membrana de larva de *T. solium*.

Diluições dos soros	Concentrações de antígeno ($\mu\text{g/orifício}$)				
	0,25 ⁽¹⁾	0,5 ⁽²⁾	1 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	4 ⁽²⁾
1:25	0,203 ^a	0,307 ^a	0,251 ^{a,b}	0,266 ^{a,b}	0,265 ^a
1:50	0,176 ^a	0,229 ^{a,b}	0,272 ^a	0,309 ^a	0,280 ^a
1:100	0,092 ^a	0,177 ^{b,c}	0,252 ^{a,b}	0,289 ^{a,b}	0,273 ^a
1:200	0,101 ^a	0,105 ^c	0,166 ^b	0,221 ^{a,b}	0,231 ^a

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

(2) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

Em geral, as quatro diluições de soro mostradas na tabela 24 mostraram reatividade estatisticamente semelhante, embora os maiores valores tenham se concentrado nas diluições 1:25 e 1:50.

Tabela 25. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes marcas de placa para o antígeno de membrana de larva de *T. solium*.

Marcas de placas	Média da diferença de D.O. ⁽¹⁾
Marca 1	0,169
Marca 2	0,165

NOTA: (1) A ausência de letras na análise da coluna significa que não houve diferença significativa entre as marcas na análise de variância ($p>0,05$).

Para este antígeno, também não se observou diferença estatística entre as marcas de placas avaliadas.

Fase 2. Avaliação do conjugado.

Tabela 26. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes diluições de conjugado e diluições de soros para o antígeno de membrana de larva de *T. solium*.

Diluições de conjugado	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽¹⁾
1:625	0,054 ^{a,b}	0,090 ^{a,b}	0,116 ^{a,c,d}	0,111 ^{a,c,d}
1:1.250	0,132 ^{a,c}	0,203 ^{a,c}	0,208 ^{a,c}	0,200 ^{a,c}
1:2.500	0,257 ^c	0,274 ^c	0,272 ^a	0,213 ^a
1:5.000	0,286 ^c	0,251 ^c	0,198 ^{a,c}	0,122 ^{a,c,d}
1:10.000	0,163 ^{a,c}	0,170 ^{a,c}	0,089 ^{b,c}	0,068 ^{b,c}
1:20.000	0,113 ^{a,b}	0,084 ^{a,b}	0,036 ^{b,d}	0,041 ^{b,d}
1:40.000	0,049 ^{a,b}	0,039 ^b	0,021 ^{b,d}	0,017 ^{b,d}

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

As diluições de conjugado 1:1.250, 1:2.500, 1:5.000 e 1:10.000 foram as que proporcionaram maiores valores para a amplitude da diferença entre soros-controle positivos e negativos. Para as duas maiores diluições, entre as quatro mencionadas, verificou-se que a diluição 1:5.000 se destacou sendo, por isso e por questões econômicas, a escolhida para prosseguir a padronização.

Como observado na análise frente aos outros antígenos, as melhores diluições de conjugado (1:1.250, 1:2.500 e 1:5.000) se diferenciaram estatisticamente das maiores diluições testadas (1:20.000 e 1:40.000), na maioria das vezes, mostrando as deficiências dessas últimas na pesquisa como um todo.

Fase 3. Avaliação do tipo de substância bloqueadora.

Tabela 27. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função de diferentes substâncias bloqueadoras e diluições de soros para o antígeno de membrana de larva de *T. solium*.

Substâncias bloqueadoras	Diluições dos soros			
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾	1:200 ⁽²⁾
Leite desnatado	0,309 ^a	0,268 ^a	0,244 ^a	0,166 ^a
Albumina	0,262 ^a	0,260 ^a	0,224 ^a	0,147 ^a
Gelatina	0,012 ^b	0,043 ^b	0,037 ^b	0,059 ^b

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

(2) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

O leite desnatado e a albumina diferenciaram-se estatisticamente da gelatina, com destaque para o primeiro, que revelou maiores valores de amplitude da diferença entre as médias de D.O. de soros positivos e negativos

4.2.6. Comparação simultânea do desempenho dos antígenos

Na Fase 4 desta primeira etapa, foram comparados, simultaneamente, os desempenhos dos cinco antígenos estudados. Nesta fase, cada um dos antígenos foi testado em suas melhores condições definidas nas fases anteriores, conforme descrito a seguir.

A concentração 1 µg de antígeno por orifício da placa foi utilizada para todos os antígenos testados. A diluição de conjugado também foi a mesma para todos, 1:5.000, exceto para o antígeno de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*, que foi de 1:2.500. Optou-se por utilizar as duas diluições de soro com melhor desempenho, 1:25 e 1:50 sendo empregados no teste dois soros-controle positivos e seis soros-controle negativos (Apêndice 7.1.4). A substância utilizada para bloquear os sítios reativos remanescentes da placa foi o leite desnatado. A marca de placa escolhida para realizar o teste e dar seqüência à padronização foi a marca 2, pois além de ser a de menor custo, não apresentou diferença estatística em relação à marca 1 em todas as situações anteriores.

O resultado da comparação entre os antígenos é mostrado na tabela 28.

Tabela 28. Média da diferença entre densidades ópticas (D.O.) de soros-controle positivos e negativos em função dos diferentes tipos de antígeno, total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de *T. crassiceps*, total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de *T. solium*, em suas melhores condições, e diluições de soros.

Tipos de antígenos	Diluições dos soros	
	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽²⁾
T-cra	0,207 ^a	0,216 ^a
V-cra	0,104 ^{b,c}	0,118 ^b
T-sol	0,184 ^{a,c}	0,208 ^a
E-sol	0,239 ^a	0,249 ^a
M-sol	0,158 ^{a,c}	0,196 ^{a,b}

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

(2) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Em geral, não houve diferença de desempenho entre os cinco antígenos estudados nesta primeira etapa. Verificou-se ligeira desvantagem em relação ao antígeno vesicular de larva de *T. crassiceps*. Uma explicação para o desempenho inferior deste último poderia ser a menor quantidade de bandas peptídicas do mesmo, que pode ser evidenciada através da eletroforese (Figura 1). Ainda assim, o antígeno vesicular guardou semelhança estatística com os antígenos de membrana e total de larva de *T. solium*, por isso a sua utilização não deveria ser descartada, mesmo porque se trata de um antígeno de preparo mais simplificado, favorecendo a obtenção de lotes antigênicos mais homogêneos. Tal característica é importante na padronização do teste ELISA.

Nota-se, em ambas as diluições de soros, que o antígeno de escólex de larva de *T. solium* foi o que apresentou os maiores valores de amplitude da diferença entre soros positivos e negativos. Em seguida, destacou-se o antígeno total de larva de *T. crassiceps*. Minozzo et al. (2004), empregando antígeno de escólex de larva de *T. solium* e total de larva de *T. crassiceps* em teste ELISA para detecção de anticorpos contra cisticercose bovina, também verificaram melhor desempenho do primeiro.

4.3. Padronização: segunda etapa

Para avaliação do desempenho do teste ELISA para diagnóstico da cisticercose bovina, procedeu-se ao ensaio de cada um dos antígenos, em suas melhores condições experimentais (item 4.2.6), frente a todos os soros discriminados na amostragem (item 3.1). A diluição de soro escolhida para a realização dos testes foi a de 1:25, pois foi a que, na maioria das situações observadas na primeira fase, proporcionou as maiores médias de diferença de D.O. entre soros-controle positivos e negativos.

Na realização desta etapa, foram empregados diferentes tipos de soros-controle, de forma a se permitir uma análise mais ampla dos resultados obtidos, visto que o comportamento do teste ELISA, principalmente em testes de padronização, pode sofrer variação em virtude de diversas situações, como: infecção discreta ou maciça, presença maior ou menor de reações inespecíficas, variação do perfil da resposta imune em diferentes estágios da doença.

Diante do exposto, na avaliação do desempenho do teste, decidiu-se por separar a análise dos resultados utilizando dois distintos pontos de corte e separando os dois tipos de soros-controle positivos. Observou-se que o ponto de corte 1 (todos os soros-controle

negativos) foi mais elevado que o 2 (somente os soros-controle de animais sob isolamento), em todos os antígenos estudados. Isto aconteceu, possivelmente, devido à maior ocorrência de reações inespecíficas dos soros de animais negativos à inspeção *post-mortem*, que foram considerados no cálculo desse ponto de corte. Como a inspeção visual é um método de baixa sensibilidade, seria possível que alguns desses animais fossem falso-negativos, o que também explicaria as reações referidas anteriormente. Assim sendo, o ponto de corte 1 pode ser visto como resultado de uma situação menos controlada de soros-controle negativos. O ponto de corte 2, por sua vez, refere-se a uma condição mais controlada de soros-controle negativos, pois foram empregadas para seu cálculo apenas as D.O. obtidas com soros de animais criados em isolamento, sob condições controladas de alimentação, situações estas que reduzem, expressivamente, o risco desses animais serem acometidos da cisticercose ou outras doenças.

Os resultados obtidos estão representados em detalhe no apêndice 7.2 e foram utilizados na determinação das freqüências de reações positivas (verdadeiras), negativas (verdadeiras), inespecíficas (positivas em soros controles negativos) e cruzadas (positivas em soros de bovinos com outras patologias). Essas freqüências foram empregadas nos cálculos de sensibilidade e especificidade, visando avaliar o desempenho do teste ELISA (Germano, 2001).

Para cada grupo de soros, considerando o ponto de corte 1, os resultados obtidos no teste ELISA estão representados na tabela 29.

Tabela 29. Número de reações positivas (Pos) e negativas (Neg) para cisticercose ao teste ELISA envolvendo os diferentes grupos de soros e os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de *T. solium* e os antígenos total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de *T. crassiceps*. Ponto de corte 1.

Grupos de soros*	Antígenos/ Tipo de reação ao teste ELISA									
	T-sol		E-sol		M-sol		T-cra		V-cra	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
1	17	3	13	7	13	7	7	13	9	11
2	2	58	1	59	1	59	3	57	3	57
3	1	9	1	9	0	10	0	10	0	10
4	1	54	3	52	2	53	4	51	1	54
5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

*1: soros de bovinos infectados experimentalmente, 2: soros de bovinos positivos à inspeção *post-mortem*, 3: soros de bovinos com outras patologias, 4: soros de bovinos negativos à inspeção *post-mortem*, 5: soros de bovinos criados em isolamento

Pela análise da tabela 29, pode-se perceber que o número de reações falso-negativas é muito elevado quando se consideram os soros de animais positivos ao exame *post-mortem* (grupo 2). Isto poderia ser explicado pela fraca resposta imunológica desses animais, cuja infecção por cisticercose geralmente é discreta, aproximando-se da resposta dos negativos. Por outro lado, o número de reações falsas reduziu quando se considerou os soros de bovinos infectados experimentalmente com ovos de *T. saginata* (grupo 1). Tais animais receberam uma alta dose de ovos do parasita, o que resultaria em uma resposta imunológica mais intensa, devido à carga parasitária provavelmente mais elevada e infecção maciça. O sacrifício de vários animais inoculados, de fato, mostrou este perfil patológico.

Observa-se, tanto com o antígeno total como com o antígeno de escólex de larva de *T. solium*, uma reação positiva com o soro de animal infectado por *Babesia sp.* (grupo 3) Como o teste foi realizado apenas uma vez e o número de amostras é limitado, testes adicionais envolvendo maior quantidade de soros de bovinos com a mesma patologia deveriam ser realizados para se chegar a uma possível conclusão sobre a existência de reação cruzada entre cisticercose e babesiose.

Em relação aos soros negativos (grupos 4 e 5), nota-se que houve reações falso-positivas apenas com os soros de animais negativos ao exame anátomo-patológico (grupo 4), o que pode ser atribuído a reações inespecíficas, mais comuns em animais criados sob condições não controladas. Entretanto, deve-se considerar a possibilidade de existirem animais falso-negativos nesse grupo, dada a baixa sensibilidade do exame anátomo-patológico.

Com base nos resultados anteriores, foram calculadas as taxas de sensibilidade e especificidade para cada antígeno, mostradas nas tabelas 30 e 31.

Tabela 30. Sensibilidade (%) do teste ELISA com os soros positivos de bovinos infectados experimentalmente (1), de bovinos examinados à inspeção *post-mortem* (2) e de ambos os grupos (1+2), considerando o ponto de corte 1, para os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de *T. solium* e total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de *T. crassiceps*.

Grupos de soros	Antígenos				
	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
1	85	65	65	35	45
2	3,3	1,7	1,7	5	5
1+2	23,7	17,5	17,5	12,5	15

Através da tabela 30, nota-se claramente que a sensibilidade do teste ELISA foi muito maior para o grupo 1 em relação ao grupo 2. Este resultado poderia ser explicado pela baixa resposta imunológica dos animais com infecção discreta (grupo 2) em relação ao grupo 1, conforme discutido anteriormente.

Geerts et al. (1981) encontraram uma sensibilidade de 37,5% no teste ELISA, observando a reação de antígeno total deslipidizado de larva de *T. crassiceps* com soros de animais procedentes de um surto de cisticercose natural detectado à inspeção *post-mortem*.

Confrontando os resultados de sensibilidade obtidos por Geerts et al. (1981) com os desta pesquisa (12,5%), verifica-se um baixo desempenho do teste no que se refere à detecção de animais positivos em condições de menor controle da doença.

Entretanto, sob condições controladas por infecção experimental, observou-se uma nítida elevação da sensibilidade do teste ELISA, chegando a 85% e mostrando-se útil na detecção de cisticercose.

Entre os antígenos, o total de larva de *T. solium* foi o que apresentou maiores valores de sensibilidade para o grupo 1 e para o grupo 1+2, suplantando ao escólex, que obteve melhor desempenho na primeira etapa. Para os grupos 1 e 1+2, os dois antígenos de larva de *T. crassiceps* apresentaram os valores de sensibilidade mais baixos em relação aos antígenos de larva de *T. solium*, considerando o ponto de corte 1.

Tabela 31. Especificidade (%) do teste ELISA com todos os soros negativos (3+4+5) e com soros de bovinos criados em isolamento (5), considerando o ponto de corte 1, para os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de *T. solium* e total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de *T. crassiceps*.

Grupos de soros	Antígenos				
	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
3+4+5	97,1	94,3	97,1	94,3	98,6
5	100	100	100	100	100

Quanto à especificidade (Tabela 31), observou-se desempenho satisfatório para todos os antígenos. A especificidade obtida concorda ainda com Geerts et al. (1981) para o antígeno total de larva de *T. crassiceps* (95,7%), caracterizando o teste ELISA como um método de alto poder discriminatório entre a cisticercose e outras doenças, com baixa taxa de reações falso-positivas. Os resultados obtidos, entretanto, contrariam os de Kyvsgaard et al. (1991),

que consideraram que a especificidade do teste ELISA foi a principal dificuldade para emprego do teste no diagnóstico individual.

A partir do ponto de corte 2, foram obtidos os resultados, no teste ELISA, para cada grupo de soros, conforme a tabela 32.

Tabela 32. Número de reações positivas (Pos) e negativas (Neg) para cisticercose ao teste ELISA envolvendo os diferentes grupos de soros e os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de *T. solium* e os antígenos total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de *T. crassiceps*. Ponto de corte 2.

Grupos de soros*	Antígenos/ Tipo de reação ao teste ELISA									
	T-sol		E-sol		M-sol		T-cra		V-cra	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
1	18	2	17	3	17	3	18	2	15	5
2	11	49	3	57	3	57	12	48	19	41
3	1	9	1	9	3	7	1	9	1	9
4	7	48	7	48	10	45	12	43	7	48
5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

*1: soros de bovinos infectados experimentalmente, 2: soros de bovinos positivos à inspeção *post-mortem*, 3: soros de bovinos com outras patologias, 4: soros de bovinos negativos à inspeção *post-mortem*, 5: soros de bovinos criados em isolamento

Analisando-se os resultados das tabelas 29 e 32, nota-se um aumento, para todos os antígenos estudados, do número de reações positivas verdadeiras quando se consideram os soros de bovinos infectados experimentalmente (grupo 1). O número de reações falso-negativas com os soros de animais positivos ao exame *post-mortem* (grupo 2) também sofreu ligeira queda, quando comparado com os resultados que se referem ao ponto de corte 1.

Quanto aos soros de outras patologias (grupo 3), percebe-se o aparecimento de reações inespecíficas do soro de animal com anaplasmoses a partir do antígeno total de larva de *T. crassiceps*, dos soros de animais com actinomicose e actinobacilose pelo antígeno de membrana de larva de *T. solium*, do soro de animal com babesiose por todos os antígenos, exceto pelo total de larva de *T. crassiceps*. Percebe-se, portanto, a ocorrência de reações inespecíficas com todos os antígenos estudados, comportamento este desfavorável em relação ao que se observou com o ponto de corte 1. Embora tais reações indiquem deficiências no teste ELISA ao utilizar o ponto de corte 2, verifica-se que a redução das taxas de especificidade não foi tão expressiva, evidenciando a grande maioria das reações negativas

verdadeiras. Nesse particular, pondera-se ainda o baixo número de amostras de outras patologias testado.

Outra desvantagem foi o aumento das reações falso-positivas com soros de animais negativos ao exame anátomo-patológico (grupo 4), em relação ao ponto de corte 1. Isto poderia ser explicado pelo fato deste grupo de soros ter apresentado grande variação de D.O., como previsto, aliado ao menor ponto de corte calculado neste caso, que aumenta o rigor do teste nesse sentido.

Baseando-se nos resultados da tabela 32, foram calculadas as taxas de sensibilidade e especificidade para cada antígeno, demonstradas nas tabelas 33 e 34.

Tabela 33. Sensibilidade (%) do teste ELISA com os soros positivos de bovinos infectados experimentalmente (1), de bovinos examinados à inspeção *post-mortem* (2) e de ambos os grupos (1+2), considerando o ponto de corte 2, para os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de *T. solium* e total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de *T. crassiceps*.

Grupos de soros	Antígenos				
	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
1	90	85	85	90	75
2	18,3	5	5	20	31,6
1+2	36,2	25	25	37,5	42,5

A partir da análise das tabelas 30 e 33, percebe-se um nítido aumento da sensibilidade do teste com relação a todos os grupos de soros. O ponto de corte 2, menor que o ponto de corte 1, representa uma condição controlada de soros-controle negativos, garantindo assim, uma melhor detecção de animais positivos, até mesmo grande parte dos moderadamente infectados. Ainda assim verificam-se baixas taxas de sensibilidade para a detecção de cisticercose discreta (no máximo dois cistos), 5 a 31,6%. Por outro lado, as taxas de sensibilidade para soros de animais inoculados foram satisfatórias, chegando a 90% para dois antígenos diferentes, total de larvas de *T. solium* e *T. crassiceps*.

Ressalta-se que, a partir desse ponto de corte, verificou-se uma expressiva elevação da taxa de sensibilidade para os antígenos de *T. crassiceps*, situada entre 75% (vesicular) e 90% (total), para animais experimentalmente infectados. No caso do ponto de corte 1, esses valores oscilaram entre 35% e 45%.

Tabela 34. Especificidade (%) do teste ELISA com todos os soros negativos (3+4+5) e com soros de bovinos criados em isolamento (5), considerando o ponto de corte 2, para os antígenos total (T-sol), de escólex (E-sol) e de membrana (M-sol) de larva de *T. solium* e total (T-cra) e de líquido vesicular (V-cra) de larva de *T. crassiceps*.

Grupos de soros	Antígenos				
	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
3+4+5	88,6	88,6	81,4	81,4	88,6
5	100	100	100	100	100

Nota-se uma queda da especificidade do teste do ponto de corte 2 para o ponto de corte 1, embora a do segundo ainda se mantivesse alta. A grande variação de D.O. dos soros de animais negativos ao exame *post-mortem* aliada ao ponto de corte menor, aumenta a chance de aparecerem resultados falso-positivos, o que reduziu a especificidade do teste nesta condição.

Ao se comparar a especificidade entre os antígenos, observa-se que os valores de todos foram muito aproximados, não cabendo nenhum destaque em particular.

Diante do exposto, percebe-se que o esquema de padronização do teste ELISA pode variar de acordo com o interesse de aplicação do mesmo, por exemplo, para situações de triagem (levantamento epidemiológico) ou de diagnóstico para liberação da carne para o consumo humano diretamente ou através de aproveitamentos condicionais, como o congelamento. Nesse aspecto, a padronização deverá considerar um certo desempenho do teste ELISA que contemple um equilíbrio desejado entre sensibilidade e especificidade.

Como se pode observar, em testes de padronização é de grande importância a seleção adequada de soros-controle para estabelecimento de um ponto de corte, pois de acordo com Smith et al. (1991) os baixos níveis de anticorpos produzidos nas infecções leves muitas vezes dificultam na seleção de um ponto de corte adequado, bem como na própria interpretação dos resultados em testes sorológicos, tal como o ELISA.

Autores que pesquisaram o teste ELISA para detecção de antígeno parasitário (Harrison et al., 1989; Draelants et al., 1995; Onyango-Abuje et al. 1996a; Van Kerckhoven et al., 1998) argumentaram que este teste é útil na identificação de portadores de cistos viáveis, o que, segundo os mesmos, seria um fato de interesse para a Saúde Pública. Entretanto, é sabido que, em um mesmo animal, coexistem cistos vivos e mortos (Urquhart, 1990; Rodrigues, 1993), pois a transmissão da doença não é estática em ambientes contaminados com ovos de *T. saginata*, onde a reinfecção é comum. Assim, o teste para detecção de anticorpos, ainda

que indique apenas a exposição à infecção, tem potencial para detectar animais cisticercósicos.

Conforme Smith et al. (1990), o desenvolvimento de anticorpos contra a cisticercose depende, no mínimo, da intensidade da infecção estabelecida e, provavelmente, também da fase de infecção em que se encontram os animais testados. Os mesmos autores argumentaram que a aplicabilidade do teste ELISA em soros de animais naturalmente infectados é questionável, devido ao elevado número de resultados falso-negativos. Como a maioria dos bovinos infectada pelo *C. bovis* exibe grau de infecção leve, a produção de anticorpos dos mesmos é baixa (Geerts et al., 1981a), dificultando assim a detecção desses animais, como pôde ser constatado no presente estudo, onde também se verificou alto número de reações falso-negativas com soros de animais detectados como positivos pela inspeção visual. Hayunga et al. (1991a) também discutiram que a sensibilidade do Imunoblot pode ser reduzida em situações naturais onde, na maioria das vezes, observam-se infecções leves.

Com relação aos antígenos empregados, observou-se um desempenho superior dos antígenos de larva de *T. solium*, particularmente do antígeno total, em relação aos antígenos de larva de *T. crassiceps*. No entanto, não se pode desmerecer o uso destes últimos visto que, em muito, seus resultados se aproximaram daqueles obtidos com os antígenos de larva de *T. solium*. Além disso, não se deve desconsiderar a facilidade de obtenção, preparação e padronização da qualidade dos antígenos de larva de *T. crassiceps*, fatores estes que reforçam a escolha dos mesmos para execução de testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-cisticercose.

5. CONCLUSÃO

Embora os antígenos de larva de *T. solium* tenham proporcionado valores mais elevados de sensibilidade, os antígenos de larva de *T. crassiceps* também comportaram-se favoravelmente ao seu emprego no diagnóstico de cisticercose bovina.

A escolha de soros-controle para o cálculo do ponto de corte interferiu de forma expressiva no desempenho do teste ELISA. Quando o ponto de corte envolvendo as médias de D.O. de soros de animais sob isolamento (situação controlada de soros negativos) foi a referência para o diagnóstico da cisticercose, os valores de sensibilidade foram bastante elevados. Por outro lado, quando o ponto de corte considerado na avaliação foi aquele calculado a partir de todos os soros-controle negativos (situação não controlada), observou-se uma queda na capacidade do teste em identificar os verdadeiros positivos.

Diante dos resultados obtidos com o presente estudo, pode-se concluir que o teste ELISA para detecção de anticorpos apresenta deficiências no diagnóstico de animais destinados ao abate, em virtude de sua baixa sensibilidade quando se consideram soros de animais com infecção natural, geralmente discreta, a mais freqüente em matadouros. No entanto, no caso de animais infectados experimentalmente, a sensibilidade aumentou. O teste ainda pode ser considerado útil na diferenciação entre a cisticercose e outras doenças, devido às suas elevadas taxas de especificidade, que sempre alcançaram o valor máximo, quando os soros-controle negativos eram procedentes de animais criados sob condição controlada. Ainda poderia ser de utilidade na rastreabilidade de animais no campo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.P.; MOREIRA, M.D.; REIS, D.O. Cisticercose Bovina: um estudo comparativo entre animais abatidos em frigoríficos com serviço de Inspeção Federal e com Inspeção Municipal. **Rev. Hig. Alim.**, v.16, n.99, p.51-55, 2002.

ALMEIDA, L.P.; REIS, D.O.; MOREIRA, M.D.; OLIVEIRA, M.E.F. Viabilidade do *Cysticercus bovis* em câmara frigorífica à temperatura de -30° C. **Rev. Hig. Alim.**, v.17, n.104/105, p.97-100, 2003.

BARRA, A.J.; FERREIRA, C.E. Demonstrativos de algumas doenças de bovinos transmissíveis ao homem. **Rev. Hig. Alim.**, v.2, n.4, p.191-192, 1983.

BARRA, A.J.; FERREIRA, C.E. Doenças de bovinos constatadas a nível de matadouro. **Rev. Hig. Alim.**, v.3, n.2, p.84-86, 1984.

BØGH, H.O.; GRØNVOLD, J.; MAEDA, G.E.; NANSEN, P. Experimental single and trickle infections of cattle with *Taenia saginata*: studies of immunodiagnosis. **Res. Vet. Sci.**, v. 60, p.64-68, 1996.

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

BRASIL/MA. **Inspeção de carnes; padronização de técnicas, instalações e equipamentos.** Brasília, DIPOA/DICAR, 1971.

BRASIL, leis, decretos, etc. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Aprovado pelo decreto 30.691 de 29/03/52, alterado pelo decreto 1.255 de 25/06/1962. Brasília, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1980.

DIAS, M.A. Eficácia da inspeção sanitária nos matadouros. **Vet. Téc.**, v.5, n.3, p.20-24, 1995.

DORNY, P.; PHIRI, I.; GABRIEL, S.; SPEYBROECK, N.; VERCRUYSSSE, J. A sero-epidemiological study of bovine cysticercosis in Zambia. **Vet. Parasitol.**, v.104, p. 211-215, 2002.

DORNY, P.; VERCAMMEN, F.; BRANDT, J.; VANSTEENKISTE, D.; BERKVEN, D.; GEERTS, S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. **Vet. Parasitol**, v.88, n.1-2, pg. 43-49, 2000.

DRAELANTS, E.; HOFKENS, E.; HARDING, E.; BRANDT, S.; GEERTS, S. Development of a Dot- enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. **Res. Vet. Sci.**, v.58, p.99-100, 1995.

FLISSER, A. ; PÉREZ-MONTFORT, R.; LARRALDE, C. The immunology of human and animal cysticercosis: a review. **Bull. World Health Organ.**, v.57, n.5, p. 839-856, 1979.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. Porto Alegre: Sulina, 1987. 453 p.

FREEMAN, R.S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. **Can. J. Zool.**, v. 40, p. 969-990, 1962.

FREITAS, J.A.; PALERMO, E.N. Complexo teníase-cisticercose. Avaliação parcial da situação no Estado do Pará. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.33, p.270-275, 1996.

FUKUDA, R.T.; SANTOS, I.F.; ANDRADE, C.R. Estudo comparativo entre técnicas de inspeção do diafragma para o diagnóstico da cisticercose bovina. **Rev. Hig. Alim**, v.12, n.55, p.51-62, 1998.

FUKUDA, R.T.; PRATA, L.F.; VERARDINO, H.; ALMEIDA, L.A.M. Evolução da cisticercose bovina em animais abatidos no estado de São Paulo. **Rev. Hig. Alim**, v.17, n.108, p.21-31, 2003.

GALLIE, G.J.; SEWELL, M.M.H. The serological response of calves infected neonatally with *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*). **Trop. Anim. Health Prod.**, v.6, p.173-177, 1974a.

GALLIE, G.J.; SEWELL, M.M.H. The serological response of three month old calves to infection with *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) and their resistance to reinfection. **Trop. Anim. Health Prod**, v.6, p.163-171, 1974b.

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

GEERTS, S.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; MORTELMANS, J. Serodiagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in experimentally and naturally infected cattle by enzyme linked immunosorbent assay. **Res. Vet. Sci.**, v.30, p. 288-293, 1981b.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Características dos métodos diagnósticos. In: **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, p.391-397, 2003.

HARRISON, L.J.S.; SEWELL, M.M.H. A comparison of the enzyme linked immunosorbent assay and the indirect haemagglutination technique applied to sera from cattle experimentally infected with *Taenia saginata* (GOEZE, 1782). **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.2, p.67-73, 1981a.

HARRISON, L.J.S.; SEWELL, M.M.H. Antibody levels in cattle naturally infected with *Taenia saginata* metacestodes in Britain. **Res. Vet. Sci**, v.31, p.62-64, 1981b.

HAYUNGA, E.G., SUMNER, M.P., RHOADS, B.A., MURRELL, D., ISENSTEIN, R.S. Development of a serologic assay for cysticercosis, using an antigen isolated from *Taenia sp* cyst fluid. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.462-470, 1991a.

HAYUNGA, E.G., SUMNER, M.P. Isolation and purification of a diagnostic antigen for bovine cysticercosis by hydrofobic chromatography. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.28, p.57-65, 1991b.

HILWIG, R.W., CRAMER , J.D.; FORSYTH, K.S. Freezing times and temperatures required to kill cysticerci of *Taenia saginata* in beef . **Vet. Parasitol**, v.4, n.3, p. 215-219, 1978.

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

JURANEK, D.D.; FORBES, L.S.; KELLER, U. *Taenia saginata* cysticerci in muscles of beef cattle. **Am. J. Vet. Res**, v.37, n.7, p.785-789, 1976.

KYVSGAARD, N.C.; ILSØE, B.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P. Distribution of *Taenia saginata* cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance for routine meat inspection. **Res. Vet. Sci**, v.49, pg.29-33, 1990.

KYVSGAARD, N.C.; ILSØE, B.; HENRIKSEN, S.A.; FELD, N.C.; NANSEN, P. Evaluation of na Enzyme –Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of *Taenia saginata* Cysticercosis in Cattle. **Acta Vet. Scand.**, v.32, p.233-241, 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LARRALDE, C., SOTELO, J., MONTOYA, R.M., PALENCIA, G., PADILLA, A., GGOVEZENSKY, T., DIAZ, M.L., SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.114, p.926-928, 1990.

LIGHTOWLERS, M.W.; ROLFE, R.; GAUCI, C.G. *Taenia saginata*: Vaccination against cysticercosis in cattle with Recombinat Oncosphere Antigens. **Exp. Parasitol.**, v.84, p.330-338, 1996.

MAEDA, G.E.; KYVSGAARD, N.C.; NANSEN, P.; BØGH, H.O. Distribution of *Taenia saginata* cysts by muscle group in naturally infected cattle in Tanzania. **Prev. Vet. Med.**, v.28, p.81-89, 1996.

MANHOSO, F.F.R. Prevalência de cisticercose bovina em animais abatidos no município de Tupã, SP (1992-1993). **Rev. Hig. Alim**, v.10, n.45, p.44-47, 1996.

McCOOL, C.J. Distribution of *Cysticercus bovis* in lightly infected young cattle. **Aust. Vet. J.**, v.55, p. 214-216, 1979.

McMANUS, D.P., BOWLES, G.L., LEGGATT, G., GARCIA-ZEPEDA, E. Some recent advances in the molecular characterization of *Echinococcus* and *Taenia solium*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v.22, p.256-261, 1991.

MINOZZO, J.C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLORTEGUI, C.C.; SOARES, V.E.; COSTA, A.J. Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra- *Cysticercus bovis*. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n.3, pg. 857-864, 2004.

MOREIRA, W.S.; SANTOS, A.F.; GUARENTI, P. J. Dados epizootiológicos obtidos através do matadouro e sua importância para a Saúde Pública. **Rev. Centro Ciênc. Rurais**, v.1, n.4, p.125-132, 1971.

MOREIRA, M.D.; REIS, D.O.; ALMEIDA, L.A. Zoonoses reemergentes: A cisticercose bovina em matadouros de Uberlândia, MG. **Rev. Hig. Alim**, v. 15, n. 85, pg. 16-19, 2001.

MURREL, K.D.; FAYER, R.; DUBEY, J.P. Parasitic Organisms. **Adv. Meat Res.**, v.2, p.311-376, 1986.

NASCIMENTO, E. Teníase e Cisticercose. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**. 10.ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.207-215, 2000.

OGUNRINADE, A.F.; OYEKOLE, O.D. Evaluation of the efficiency of beef inspection procedures for tuberculosis, fascioliasis and cysticercosis in a nigerian abattoir. **Prev. Vet. Med.**, v.8, p. 71-75, 1990.

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

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE / INSTITUTO PAN-AMERICANO DE PROTEÇÃO DE ALIMENTOS – OPAS/INPPAZ. **HACCP: Instrumento Essencial para a Inocuidade de Alimentos**. Buenos Aires, Argentina. 2001. 333p.

PASSOS, L.M.F. **Immunological studies on bovine babesiosis with particular reference to Brazil using “in vitro” culture-derived antigens**. Edinburg: Centre for Tropical Veterinary Medicine, 1993. Tese (PhD)- Centre for Tropical Veterinary Medicine, 1993.

PFUETZENREITER, M.R.; ÁVILA-PIRES, F.D. Epidemiologia da teníase/ cisticercose por *Taenia solium* e *Taenia saginata*. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 541-548, 2000.

PINTO, P.S.A., VAZ, A.J., GERMANO, P.M.L., NAKAMURA, P.M. Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. **Vet. Parasitol**, v.88, p.127-130, 2000.

QUEIROZ, R.P.V., SANTOS, W.L.M., BARBOSA, H.V., SOUZA, R.M., SANTOS FILHO, A.M.P. A importância do diagnóstico da cisticercose bovina. **Rev. Hig. Alim**, v.14, n.77, p.12-15, 2000.

REIS, D.O.; RAGHIANTE, F. Cisticercose Bovina: Tendência da doença em animais abatidos em um frigorífico de Uberlândia, MG, sob Inspeção Federal, 1994-1998. **Rev. Hig. Alim**, v.14, n.70, p.20-22, 2000.

REIS, D.O.; MUNDIM, M.J.S.; CABRAL, D.D.; COSTA-CRUZ, J.M. Cisticercose bovina: 15 anos de ocorrência em animais abatidos em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil- 1979 a 1993. **Rev. Hig. Alim**, v.10, n. 43, pg.33-35, 1996.

RICKARD, M.D.; ADOLPH, A.J. Vaccination of calves against *Taenia saginata* infection using a “parasite-free” vaccine. **Vet. Parasitol**, v.1, p.389-392, 1976.

RODRIGUES, L.V.C. Inspeção sanitária e critério de julgamento da cisticercose bovina calcificada. Infecção leve. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.23, n.3, pg.339-344, 1993.

SANTOS, I.F. Diagnóstico da cisticercose bovina em matadouros. III-Exame dos pilares diafragmáticos. **Rev. Hig. Alim**, v.7, n.25, p.26-34, 1993.

SANTOS, I.F. **Nova técnica de exame do coração na rotina de Inspeção da Cisticercose Bovina**. Niterói, RJ: UFF, 1975. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 1975.

SANTOS, I.F. O *Cysticercus bovis* (forma larvar da *Taenia saginata*) pode infectar o homem? **Rev. Hig. Alim**, v.10, n.44, p.13-14, 1996.

SANTOS, I.F.; MANO, S.B.; TORTELLY, R.; SANTOS, M.L.S.; SILVA, D.A.S. Estudo da localização do *Cysticercus bovis* em corações de bovinos abatidos sob inspeção. **Rev. Hig. Alim**, v.15, n.89, p.37-44, 2001.

SCHANDEVYL, P., VERCRUYSSSE, J. Cysticercosis in cattle in Senegal. **Vet. Parasitol**, v.11, p.267-270,1982.

SISTEMA de análise estatística e genética (SAEG). Viçosa, MG: Folha de Viçosa Ltda., 1999.

SMITH,H. J.; SNOWDON, K.E.; GREGORY, D.; FINLEY, G.G. Assessment of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay using a *Taenia hydatigena* fraction antigen in the diagnosis of cysticercosis in cattle. **Can. J. Vet. Res.**, v.54, p. 299-300, 1990.

SMITH, H.J.; SNOWDON, K.E.;FINLAY, R.C. Serological Diagnosis of Cysticercosis by na Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Experimentally Infected Cattle. **Can. J. Vet. Res.**, v.55, p.274-276, 1991.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. In: **Anal. Biochem**, v.150, p.76-85, 1985.

SOULSBY, E.J.L. **Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals**. 7.ed. London: Bailliere Tindall, p.107-111, 1982.

SOUZA, R.M.; ANTUNES, C.F.; GUATIMOSIM, C.B.; RIBEIRO, R.M.P.; OLIVEIRA, A.L.; SANTOS, W.L. M. A importância do Serviço de Inspeção Federal na Vigilância Sanitária de Alimentos- Cisticercose Bovina. **Rev. Hig. Alim**, v.11, n.48, p. 19-21, 1997.

STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Molec. Biol.**, v.79, p.237-248, 1973.

UNGAR, M.L.; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. Cisticercose Bovina. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, p.335-343, 2001.

UNGAR, M.L.; GERMANO, P.M.L. Epidemiologia e Controle da Cisticercose Bovina. **Comum. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo**, v.15, n.1, p.15-20, 1991.

UNGAR, M.L.; GERMANO, P.M.L. Prevalência da cisticercose bovina no Estado de São Paulo (Brasil). **Rev Saúde Públ.**, São Paulo, v.26, n.3, p.167-172, 1992.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. Ed. Guanabara Koogan, 1990. 306 p.

VAN KERCKHOVEN, I.; VANSTEENKISTE, W.; CLAES, M.; GEERTS, S. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. **Vet. Parasitol**, v.76, p.269-274, 1998.

VAZ, A.J. Diagnóstico da teníase e da cisticercose humana. In: ENCONTRO DO CONE SUL E SEMINÁRIO LATINO AMERICANO SOBRE TENÍASE E CISTICERCOSE, 1, 1994, Curitiba. **Anais ...** s.n., Curitiba: SESA/UFPR/OPAS/MS-FNS, p.110-116, 1994.

WALTHER, M.; KOSKE, J.K. *Taenia saginata* cysticercosis: A comparison of routine meat inspection and carcass dissection results in calves. **Vet. Rec.**, v.106, p.401-402, 1980.

WIKERHAUSER, T.; ZUKOVIC, M.; DZAKULA, N.; TIMET, D.; CENA, H.; MARAN, B.; REZIC, I.; KUTICIC, V. A study of active and passive immunizations of calves against the infection with *Taenia saginata* eggs. **Acta Parasitol. Iugosl.**, v.5, n.2, p. 87-100, 1974.

ZAMPINI, L. M. Cisticercose bovina no Paraná no período de 1982 a 1988. **Rev. Hig. Alim**, v.8, n.30, p. 24-25, 1994.

7. APÊNDICES

Apêndice 7.1. Primeira etapa da padronização

7.1.1. Esquema de montagem da placa de ELISA na FASE 1 (titulação em bloco de antígeno e soros e avaliação de marcas de placa)

Marca de placa 1

		0,25 µg				0,5 µg				1 µg			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:25	A	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
1:50	B												
1:100	C												
1:200	D												
1:400	E												
1:800	F												
1:1600	G												
1:3200	H												

Marca de placa 2

		1 µg				2 µg				4 µg			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:25	A	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
1:50	B												
1:100	C												
1:200	D												
1:400	E												
1:800	F												
1:1600	G												
1:3200	H												

7.1.2. Esquema de montagem da placa de ELISA na FASE 2 (titulação em bloco de soros e conjugado)

		1:625			1:1.250			1:2.500			1:5.000		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:25	A	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
1:50	B												
1:100	C												
1:200	D												
1:25	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	F												
1:100	G												
1:200	H												

		1:5.000			1:10.000			1:20.000			1:40.000		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:25	A	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
1:50	B												
1:100	C												
1:200	D												
1:25	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	F												
1:100	G												
1:200	H												

7.1.3. Esquema de montagem da placa de ELISA na FASE 3 (avaliação das substâncias bloqueadoras)

		Gelatina				Albumina				Leite desnatado			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:25	A	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
1:50	B												
1:100	C												
1:200	D												
1:25	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	F												
1:100	G												
1:200	H												

7.1.4. Esquema de montagem da placa de ELISA na FASE 4 (Comparação entre antígenos)

		T-sol		V-cra		T-cra		E-sol		M-sol			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:25	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:50	B												
1:25	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	D												
1:25	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	F												
1:25	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	H												

Apêndice 7.2. Segunda etapa da padronização

7.2.1. Densidades ópticas de soro de bovinos infectados experimentalmente ao teste ELISA (n=20)

Amostra	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
261	0,311	0,314	0,244	0,255	0,299
262	0,377	0,405	0,467	0,398	0,280
263	0,211	0,185	0,232	0,204	0,189
264	0,237	0,218	0,227	0,263	0,251
265	0,347	0,303	0,314	0,272	0,248
266	0,372	0,377	0,348	0,214	0,236
267	0,450	0,467	0,481	0,320	0,287
268	0,435	0,453	0,487	0,279	0,251
269	0,492	0,449	0,413	0,256	0,213
270	0,493	0,482	0,444	0,525	0,242
271	0,501	0,459	0,484	0,539	0,234
272	0,477	0,412	0,433	0,368	0,189
273	0,477	0,376	0,351	0,249	0,190
274	0,486	0,464	0,486	0,365	0,258
275	0,426	0,388	0,387	0,269	0,316
276	0,388	0,314	0,326	0,271	0,295
277	0,350	0,326	0,265	0,281	0,167
278	0,435	0,409	0,429	0,239	0,279
279	0,354	0,262	0,322	0,379	0,305
280	0,441	0,456	0,417	0,244	0,277
Média	0,403	0,372	0,378	0,310	0,250
Desvio Padrão	0,084	0,087	0,090	0,093	0,043
Ponto de Corte 1	0,341	0,350	0,329	0,291	0,257
Reações Negativas	3/20	7/20	7/20	13/20	11/20
Ponto de Corte 2	0,269	0,297	0,263	0,215	0,218
Reações Negativas	2/20	3/20	3/20	2/20	5/20

7.2.2. Densidades ópticas de soros de bovinos considerados positivos para cisticercose na inspeção *post-mortem* no teste ELISA (n= 60)

Amostra	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
01	0,119	0,191	0,145	0,204	0,131
02	0,197	0,237	0,265	0,180	0,240
03	0,194	0,201	0,176	0,182	0,178
04	0,342	0,320	0,238	0,232	0,243
05	0,139	0,128	0,137	0,163	0,203
06	0,114	0,188	0,154	0,181	0,218
07	0,157	0,211	0,181	0,152	0,185
08	0,238	0,224	0,219	0,275	0,215
09	0,113	0,144	0,136	0,147	0,113

7.2.2. Densidades ópticas de soros de bovinos considerados positivos para cisticercose na inspeção *post-mortem* no teste ELISA (n= 60). (continuação)

Amostra	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
10	0,110	0,128	0,127	0,189	0,205
11	0,142	0,169	0,115	0,134	0,183
12	0,153	0,172	0,143	0,186	0,239
13	0,170	0,181	0,136	0,160	0,173
14	0,201	0,248	0,210	0,140	0,190
16	0,134	0,133	0,121	0,085	0,143
18	0,241	0,191	0,209	0,171	0,156
23	0,287	0,349	0,283	0,161	0,184
28	0,166	0,213	0,210	0,160	0,204
30	0,178	0,175	0,222	0,144	0,145
35	0,474	0,460	0,451	0,293	0,244
38	0,127	0,219	0,143	0,118	0,127
39	0,194	0,248	0,201	0,164	0,186
40	0,119	0,116	0,134	0,116	0,156
42	0,117	0,113	0,131	0,133	0,137
50	0,223	0,222	0,182	0,112	0,207
53	0,132	0,120	0,122	0,118	0,210
55	0,149	0,103	0,127	0,158	0,182
56	0,221	0,146	0,220	0,102	0,227
61	0,153	0,102	0,127	0,102	0,178
63	0,193	0,123	0,158	0,101	0,212
65	0,196	0,176	0,163	0,119	0,216
67	0,156	0,133	0,178	0,114	0,213
71	0,172	0,129	0,104	0,125	0,229
74	0,092	0,065	0,115	0,102	0,211
76	0,154	0,166	0,158	0,129	0,220
78	0,190	0,144	0,140	0,142	0,181
82	0,337	0,211	0,167	0,164	0,199
83	0,211	0,135	0,127	0,117	0,178
84	0,112	0,095	0,104	0,124	0,200
86	0,138	0,185	0,189	0,183	0,228
119	0,161	0,120	0,143	0,133	0,211
120	0,235	0,192	0,207	0,164	0,221
122	0,179	0,159	0,155	0,125	0,209
134	0,170	0,111	0,155	0,124	0,213
136	0,212	0,153	0,112	0,138	0,221
140	0,285	0,232	0,190	0,182	0,237
141	0,128	0,121	0,131	0,129	0,265
143	0,228	0,208	0,221	0,193	0,305
146	0,278	0,187	0,195	0,230	0,214
148	0,301	0,230	0,193	0,281	0,181
152	0,308	0,236	0,260	0,459	0,248

7.2.2. Densidades ópticas de soros de bovinos considerados positivos para cisticercose na inspeção *post-mortem* no teste ELISA (n= 60). (continuação)

Amostra	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
153	0,255	0,251	0,220	0,232	0,192
154	0,195	0,123	0,151	0,213	0,178
174	0,271	0,220	0,211	0,238	0,242
176	0,271	0,262	0,239	0,303	0,240
177	0,297	0,289	0,250	0,279	0,221
20	0,263	0,204	0,234	0,277	0,308
25	0,265	0,169	0,245	0,271	0,173
26	0,156	0,153	0,147	0,201	0,184
27	0,230	0,145	0,152	0,187	0,184
Média	0,199	0,183	0,178	0,174	0,202
Desvio Padrão	0,072	0,067	0,058	0,066	0,038
Ponto de Corte 1	0,341	0,350	0,329	0,291	0,257
Reações Negativas	58/60	59/60	59/60	57/60	57/60
Ponto de Corte 2	0,269	0,297	0,263	0,215	0,218
Reações Negativas	49/60	57/60	57/60	48/60	41/60

7.2.3. Densidades ópticas de soros de bovinos criados em isolamento no teste ELISA (n= 5)

Amostra	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
246	0,097	0,157	0,169	0,127	0,145
250	0,172	0,195	0,232	0,200	0,158
252	0,233	0,281	0,225	0,125	0,084
253	0,135	0,150	0,183	0,128	0,149
254	0,190	0,182	0,148	0,163	0,183
Média	0,165	0,193	0,191	0,149	0,144
Desvio Padrão	0,052	0,052	0,036	0,033	0,036
Ponto de Corte 1	0,341	0,350	0,329	0,291	0,257
Reações inespecíficas	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Ponto de Corte 2	0,269	0,297	0,263	0,215	0,218
Reações inespecíficas	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

7.2.4. Densidades ópticas de soros de bovinos portadores de outras patologias no teste ELISA (n=10)

Amostra	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
188	0,130	0,118	0,117	0,116	0,136
190	0,207	0,236	0,293	0,128	0,204
191	0,236	0,291	0,287	0,160	0,168
192	0,112	0,235	0,187	0,079	0,154
248	0,228	0,202	0,196	0,234	0,084
255	0,198	0,154	0,176	0,173	0,071
256	0,417	0,397	0,317	0,210	0,228
257	0,162	0,143	0,109	0,136	0,149
258	0,263	0,024	0,149	0,110	0,159
259	0,135	0,032	0,093	0,197	0,181
Média	0,209	0,183	0,192	0,154	0,153
Desvio Padrão	0,089	0,115	0,081	0,049	0,048
Ponto de Corte 1	0,341	0,350	0,329	0,291	0,257
Reações inespecíficas	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10
Ponto de Corte 2	0,269	0,297	0,263	0,215	0,218
Reações inespecíficas	1/10	1/10	3/10	1/10	1/10

7.2.5. Densidades ópticas de soros de bovinos considerados negativos para cisticercose na inspeção *post-mortem* no teste ELISA (n=55)

Amostra	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
107	0,266	0,256	0,236	0,218	0,169
193	0,135	0,176	0,212	0,109	0,153
194	0,185	0,240	0,217	0,140	0,157
195	0,156	0,227	0,124	0,109	0,150
196	0,370	0,302	0,236	0,301	0,140
197	0,160	0,183	0,162	0,182	0,169
198	0,134	0,130	0,127	0,111	0,175
199	0,243	0,274	0,300	0,267	0,203
200	0,281	0,365	0,245	0,240	0,143
201	0,248	0,302	0,237	0,210	0,170
202	0,335	0,356	0,315	0,329	0,157
203	0,022	0,164	0,176	0,150	0,165
204	0,087	0,161	0,086	0,088	0,132
205	0,107	0,175	0,152	0,141	0,153
206	0,101	0,161	0,173	0,135	0,147
207	0,269	0,247	0,273	0,251	0,212
208	0,109	0,253	0,235	0,138	0,158
209	0,138	0,238	0,225	0,136	0,154
210	0,191	0,154	0,174	0,123	0,158
211	0,100	0,194	0,202	0,142	0,179
212	0,145	0,287	0,185	0,124	0,187
213	0,229	0,308	0,200	0,104	0,171
214	0,260	0,236	0,230	0,187	0,144
215	0,259	0,154	0,176	0,210	0,141
216	0,216	0,141	0,164	0,135	0,166
217	0,221	0,225	0,166	0,210	0,172
218	0,238	0,217	0,208	0,153	0,144
219	0,216	0,160	0,185	0,146	0,110
221	0,239	0,150	0,162	0,194	0,143
222	0,180	0,181	0,186	0,198	0,129
223	0,254	0,279	0,272	0,247	0,333
224	0,266	0,199	0,194	0,166	0,192
225	0,293	0,189	0,263	0,194	0,137
226	0,258	0,260	0,247	0,188	0,200
227	0,186	0,096	0,073	0,116	0,115
228	0,251	0,166	0,159	0,168	0,140
229	0,265	0,237	0,277	0,168	0,176
230	0,229	0,239	0,205	0,168	0,219
231	0,120	0,129	0,115	0,125	0,197
232	0,145	0,133	0,105	0,132	0,165
233	0,262	0,277	0,225	0,125	0,157
235	0,133	0,145	0,111	0,131	0,255

7.2.5. Densidades ópticas de soros de bovinos considerados negativos para cisticercose na inspeção *post-mortem* no teste ELISA (n=55).(continuação)

Amostra	T-sol	E-sol	M-sol	T-cra	V-cra
236	0,151	0,193	0,124	0,131	0,142
237	0,231	0,266	0,259	0,234	0,218
238	0,190	0,167	0,231	0,201	0,256
239	0,146	0,036	0,101	0,195	0,170
240	0,140	0,068	0,137	0,145	0,175
241	0,171	0,051	0,165	0,187	0,187
242	0,319	0,301	0,355	0,313	0,254
243	0,169	0,100	0,167	0,215	0,225
244	0,241	0,270	0,293	0,242	0,190
245	0,236	0,193	0,192	0,193	0,188
97	0,236	0,220	0,281	0,172	0,197
101	0,166	0,112	0,168	0,146	0,162
105	0,316	0,352	0,386	0,336	0,178
Média	0,204	0,205	0,201	0,179	0,171
Desvio Padrão	0,071	0,075	0,066	0,059	0,044
Ponto de Corte 1	0,341	0,350	0,329	0,291	0,257
Reações inespecíficas	1/55	3/55	2/55	4/55	1/55
Ponto de Corte 2	0,269	0,297	0,263	0,215	0,218
Reações inespecíficas	7/55	7/55	10/55	12/55	7/55

7.2.6. Relação das patologias/ infecções dos soros de animais com outras patologias

Amostra	Patologia/Infecção
188	Actinomicose
190	Actinomicose
191	Actinobacilose
192	Fasciolose
248	Anaplasnose
255	Anaplasnose
256	Babesiose
257	Babesiose
258	Anaplasnose + Babesiose
259	Anaplasnose

ANEXO A

Soluções para o teste ELISA

1- Tampão Carbonato- Bicarbonato pH 9,6 (0,05M)

Na ₂ CO ₃	0,318 g
NaHCO ₃	0,586 g
H ₂ O destilada q.s.p.	200 mL

Acertar o pH para 9,6.
Armazenar em geladeira.

2- Solução Salina (0,15M)

NaCl	8,5 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

3- PBS pH 7,4 (0,02M)

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KCl	0,20 g

Dissolver os sais em, mais ou menos, 800 mL de água destilada. Acertar o pH para 7,4 e completar o volume para 1000 mL. Armazenar em geladeira.

4- Tampão citrato-fosfato pH 5,0 (0,2M)

Ácido Cítrico	2,10 g	+/- 400 mL H ₂ O destilada
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	35,6 g	+/- 400 mL H ₂ O destilada

Misturar as soluções e acertar o pH para 5,0. Completar o volume para 1000 mL. Armazenar em geladeira.

5- Solução de bloqueio da reação

H ₂ SO ₄	53,26 mL
H ₂ O destilada	446,74 mL

Guardar à temperatura ambiente.

ANEXO B

Reagentes do teste ELISA

1- Solução de incubação do antígeno

Solução tamponada carbonato-bicarbonato pH 9,6

2- Solução de bloqueio da placa

Leite desnatado	5,0 g
PBS pH 7,4	100 mL

3- Solução de diluições de amostras e conjugado

Leite desnatado 5% em PBS	20 mL
PBS pH 7,4 q.s.p.	100 mL

4- Solução de lavagem de placa

Solução salina 0,15 M	1000 mL
Tween 20	0,5 mL

Armazenar em geladeira. Desprezar se turvar.

5- Solução Substrato para enzima peroxidase

Tampão citrato-fosfato pH 5,0	10 mL
Orto-phenylenediamine (OPD)	0,010 g
H ₂ O ₂ a 30 %	0,010 mL

ANEXO C

Soluções para dosagem protéica utilizando o Ácido Bicinconínico

1- Reagente A

1% BCA-Na ₂	1 g
2% Na ₂ CO ₃ .H ₂ O	2 g
0,16% Tartarato de sódio.2H ₂ O	0,16 g
0,45% NaOH	0,45 g
0,95% NaHCO ₃	0,95 g
H ₂ O q.s.p.	100 mL

Ajustar o pH para 11,25 adicionado NaOH 50%.

2- Reagente B

4% CuSO ₄ .5H ₂ O	4 g
H ₂ O q.s.p.	100 mL

3- Solução de Trabalho (para uma amostra)

Reagente A	1,96 mL
Reagente B	0,04 mL

ANEXO D

Soluções para eletroforese:

1- Solução A

Acrylamida	30 g
Bis-Acrylamida	0,8 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	100 mL

Adicionar a água sobre a acrilamida e manter a solução a 56° C coberta com parafilm até a dissolução completa. Filtrar a solução e guardar em frasco escuro. Pode ser conservada durante 3 a 4 meses no congelador.

2- Solução B

Trizma base 1,5 M (pH 8,8)	18,27 g
SDS 20% (p/v)	2 mL
H ₂ O bidestilada q.s.p.	100 mL

Adicionar 50 mL de água e acertar o pH para 8,8 com HCl 6 N. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução. Estável durante meses no refrigerador.

3- Solução C

Trizma base 0,5 M (pH 6,8)	6,06 g
SDS 20% (p/v)	2 mL
H ₂ O bidestilada q.s.p.	100 mL

Adicionar 50 mL de água e acertar o pH para 6,8 com HCl 6 N. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução. Estável durante meses no refrigerador.

4- SDS a 20%

SDS (p/v)	10 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	50 mL

5- Persulfato de Amônio a 10%

Persulfato de Amônio	0,5 g
H ₂ O bidestilada	5 mL

Distribuir em alíquotas e manter congelada a – 20° C.

6- Tampão de Corrida pH 8,3

Trizma 25 mM	3,0 g
Glicina 192 mM	14,4 g
SDS 0,1 %	1,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

7- Tampão de Amostra 5X

Trizma 60 mM (pH 6,8)	0,6 mL 1M
Glicerol 25 %	2,5 mL
SDS 2%	1,0 mL a 20 %
2- mercaptoetanol 14,4 mM	0,5 mL
Azul de Bromofenol 0,1 %	1,0 mL a 1 %
H ₂ O bidestilada	4,4 mL

Distribuir em alíquotas e estocar a – 20°C.

8- Gel de separação

	Gel a 5 %	Gel a 20 %
H ₂ O bidestilada	5,8 mL	0,8 mL
Solução A	1,7 mL	6,7 mL
Solução B	2,5 mL	2,5 mL
Persulfato de Amônio	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	0,01 mL	0,005 mL

9- Gel de empilhamento a 5 %

H ₂ O bidestilada	4,6 mL
Solução A	1,34 mL
Solução C	2,0 mL
Persulfato de amônio	0,06 mL
TEMED	0,01 mL

ANEXO E

Soluções para coloração de proteínas com Comassie blue:

1- Solução Fixadora

Metanol	40 mL
Ácido Acético	10 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	100 mL

2- Corante Azul brilhante de Comassie

Comassie blue R-250	1 g
Metanol	450 mL
H ₂ O destilada	450 mL
Ácido Acético glacial	100 mL

3- Solução Descorante

Ácido Acético glacial	70 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

Procedimentos:

- Separar as placas de vidro do gel com auxílio de uma espátula
- Retirar o gel de empilhamento cortando cuidadosamente com um estilete
- Transferir o gel para uma cuba contendo a solução fixadora e deixar 30 minutos à temperatura ambiente
- Desprezar a solução e deixar no corante durante 10 minutos a 56° C
- Retirar o corante e adicionar o descorante
- Descorar a 56° C, durante 20 minutos, 3 vezes.