

ALINE GIROTTO

**AVALIAÇÃO DO IMUNOBLOT NO 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
2007**

ALINE GIROTTO

AVALIAÇÃO DO IMUNOBLOT NO 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*.

APROVADA: 17 de julho de 2007.

Prof. Sérgio Oliveira de Paula
(Co-orientador)

Prof. Luís Augusto Nero
(Co-orientador)

Prof. Jackson Víctor de Araújo

Prof. Joaquin H. Patarroyo Salcedo

Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto
(Orientador)

Aos meus pais Ademir e Elci

Por todas as vezes que vocês estiveram ao meu lado. Por toda a verdade que vocês me fazem ver. Por toda a alegria que vocês trazem para a minha vida. Por tudo de errado que vocês tornam correto. Por todo sonho que vocês tornam realidade. Por todo amor que encontro em vocês. Serei eternamente agradecida!!!. Vocês são minha força quando eu estou fraca, minha voz quando eu não posso falar, meus olhos quando eu não posso ver. Vocês são minha inspiração!!! E com toda certeza posso dizer que hoje, eu sou eu em minhas particularidades, mas em tudo que eu faço há muito mais de vocês do que um dia eu poderia supor. Amo vocês!!!

Ao Marcio

Se hoje comemoro uma conquista, esta se deve também a ti, que estás ao meu lado em todos os momentos, que faz dos meus sonhos teus próprios objetivos e de meus objetivos tua própria luta. Tu me ofereces sempre o melhor através do olhar de apoio, da tua palavra de incentivo, do teu gesto de compreensão e de tua atitude de segurança, mesmo quando me vêm o desânimo. Nos momentos importantes, suporta minha ausência e nos dias de fracasso respeita meus sentimentos. Se hoje estou aqui, é porque tu acreditas em meu sucesso e caminhas agora a meu lado. Obrigada pelo amor, pela paciência e pelo companheirismo. Te amo!

Ao meu irmão e a minha avó Marina

À vocês que muito amo e que mesmo no silêncio e na distância me dão força pra continuar sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo imensurável dom da vida e pelas valiosas oportunidades concedidas.

Ao Prof. Dr. Paulo Sergio, pela amizade, pela orientação e confiança em mim depositada e pelo estímulo concedido para realização deste trabalho.

À Rosi, secretária da coordenação de pós-graduação e aos funcionários dos laboratórios da Veterinária Preventiva, em especial ao Dagoberto, pela ajuda prestada sempre que necessária.

Aos professores, estagiários e funcionários do laboratório de biologia celular do Departamento de Biologia, sobretudo aos professores Sergio e Tânia, pela concessão do laboratório para realização de parte deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, pela amizade, pelos momentos de descontração e pelo apoio, fundamentais nesta minha passagem por Viçosa.

As grandes amigas Bianca, Elizabeth, Cristina, Angélica, Daniella, Vivian, Daniele e Gleides, pela amizade e alegria sempre presentes.

Aos amigos e estagiários do laboratório de inspeção de produtos de origem animal, especialmente ao Júlio, pela paciência, grande auxílio, amizade e ótimas risadas.

A Universidade Federal de Viçosa e a todos os professores que tive nestes 2 anos na pós-graduação, pelos ensinamentos e paciência em transmiti-los.

As impressões não dizem absolutamente nada do que sou,
conhecer uma pessoa vai muito além do que ela parece,
do que ela escreve, do que ela gosta. Dura uma vida
construir e mostrar o que somos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. REVISÃO DE LITERATURA	05
Histórico e importância econômica da cisticercose	05
3.2. Aspectos biológicos da <i>Taenia saginata</i>	17
3.3. Aspectos epidemiológicos	06
3.3.1. Características epidemiológicas do complexo teníase-cisticercose	08
3.3.2. Prevalência da cisticercose bovina	10
3.4. Resposta humoral de bovinos com cisticercose	12
3.5. Diagnóstico e controle de bovinos com cisticercose	13
3.6. Diagnóstico imunológico da cisticercose bovina	15
3.6.1. Antígenos empregados no imunodiagnóstico	15
3.6.2. Métodos imunológicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Amostragem	21
4.2. Preparo do material	21
4.2.1. Infecção experimental dos bovinos	21
4.2.2. Obtenção da forma larvária da <i>Taenia saginata</i> (<i>Cysticercus bovis</i>)	22
4.2.3. Obtenção da forma larvária da <i>Taenia crassiceps</i> (<i>Cysticercus longicollis</i>)	23
4.2.4. Preparo do antígeno total de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> (Tcr)	24
4.2.5. Preparo do antígeno vesicular de cisticercos de (LVcr)	25
4.2.6. Preparo do antígeno total de cisticercos de <i>Taenia saginata</i> (Tsag)	25
4.2.7. Dosagem de proteínas	25
4.2.8. ELISA	25
4.3. Ensaio de padronização	27
4.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
4.3.1.1. Técnica básica	27
4.3.1.2. Padronização	27
4.3.2. Imunoblot	29
4.3.2.1. Técnica básica	29
4.3.2.2. Padronização	31
4.4. Avaliação do desempenho do imunoblot	31
4.4.1. Avaliação dos peptídeos reativos	31
4.4.2. Comparação dos diferentes tipos de antígenos	33
4.4.3. Análise dos resultados	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência de proteínas reativas empregando o antígeno LVcra e soros-controle de bovinos positivos experimentalmente e naturalmente, negativos e com outras patologias, no imunoblot	37
Tabela 2 – Frequência de proteínas reativas empregando o antígeno Tcra e soros-controle de bovinos positivos experimentalmente e naturalmente, negativos e com outras patologias, no imunoblot	38
Tabela 3 - Frequência de proteínas reativas empregando o antígeno Tsag e soros-controle de bovinos positivos experimentalmente e naturalmente, negativos e com outras patologias, no imunoblot	39
Tabela 4 – Taxas de desempenho (%) das proteínas reativas no imunoblot empregando o antígeno LVcra	40
Tabela 5 – Taxas de desempenho (%) das proteínas reativas no imunoblot empregando o antígeno Tcra	41
Tabela 6 – Taxas de desempenho (%) das proteínas reativas no imunoblot empregando o antígeno Tsag	42
Tabela 7 – Taxas de desempenho (%) das proteínas importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina no imunoblot, empregando os antígenos LVcra, Tcra e Tsag	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – *Cysticercus bovis* (pinça) em coração de bovino portador de infecção generalizada.....23
- Figura 2 – Camundongo experimentalmente inoculado apresentando cisticercos intraperitonealmente, após retirada do tecido cutâneo.....24
- Figura 3 – SDS-PAGE – 5 e 20%, corado pelo comassie blue dos antígenos Tcra, LVcra e Tsag. 1- Tcra , 2- Lvra, 3- Tsag e PM- Padrão de peso molecular (205, 116, 97, 84, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20, 14 e 6,5 Kda).....28
- Figura 4 - Obtenção das tiras de nitrocelulose após transferência, para utilização na fase de detecção imunológica do imunoblot30
- Figura 5 - Disposição das tira de nitrocelulose na cuba para fase de detecção imunológica no imunoblot . Soros positivos experimentalmente (1 e 2), positivos naturalmente (3 e 4), negativos (5 e 6) e com outras enfermidades (7 e 8).....32
- Figura 6 - Nível de IgG (0-165 dias) em densidade óptica, por meio do teste de ELISA, dos animais infectados experimentalmente.....34
- Figura 7 – Detecção de anticorpos pelo imunoblot nas diferentes fases de infecção experimental (0-225 dias), nos soros 181, 182, 183 e 184, utilizando o padrão de peso molecular (PM-14, 20, 24, 29, 36, 55, 66, 84, 97, 205Kda) e o controle branco (BC).....35
- Figura 8 - Quantidade e aspecto físico das proteínas detectadas pelos antígenos LVcra, Tcra e Tsag nos soros de animais experimentalmente (+exp) e naturalmente infectados (+nat), negativos (-) para cisticercose e com outras patologias (OP) e Padrão de peso molecular (PM).....45

RESUMO

GIROTTO, Aline, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Avaliação do imunoblot no diagnóstico da cisticercose bovina.** Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto. Co-orientadores: Luís Augusto Nero e Sérgio Oliveira de Paula

A cisticercose bovina é uma doença causada pela larva de *Taenia saginata*, denominada *Cysticercus bovis*. Recentemente, tem sido sugerida, como alternativa para o diagnóstico da doença, a implementação de testes imunológicos, dentre eles o Imunoblot, que tem por princípio a detecção de anticorpos no soro. O presente trabalho objetiva a avaliação do desempenho do imunoblot no imunodiagnóstico da cisticercose bovina, bem como, dos antígenos de *Taenia saginata* e *Taenia crassiceps*. Os antígenos de *Taenia saginata* (Tsag) foram obtidos através da infecção experimental dos bezerros e os de *Taenia crassiceps* (LVcra e Tcra), através da infecção experimental em camundongos balb/c. Os antígenos foram testados no Immunoblotting frente a quatro grupos de soros-controle: 28 amostras de soro de animais experimentalmente infectados, 32 de animais naturalmente infectados, 28 sem doenças e 19 com outras patologias. Foram selecionados os peptídeos que reagiram somente com os soros positivos, os quais foram identificados como importantes, observando os critérios de localização (peso molecular), bem como sua aparência física, particularmente a intensidade de cor. As bandas de 4-6, 14 e 18KDa destacaram-se entre as outras, mostrando as mais altas taxas de desempenho e um perfil diferenciado, com área e altura maiores, semelhantes a uma mancha. Os peptídeos de 4-6KDa apresentaram as taxas de 66,7, 66,7 e 50% de sensibilidade e 97,5, 84,6 e 96,2% de especificidade quando utilizados os antígenos LVcra, Tcra e Tsag, respectivamente. O peptídeo de 14KDa apresentou 87,5, 87,5 e 77,8% de sensibilidade e 97,5, 94,9 e 100% de especificidade com os antígenos LVcra, Tcra e Tsag, respectivamente. O peptídeo de 18KDa apresentou para LVcra, Tcra e Tsag, respectivamente, valores de 75, 41,7 e 88,9% de sensibilidade e 97,5, 89,7 e 92,3% de especificidade. Não foram observadas reações cruzadas com outras doenças entre as três preparações antigênicas e os peptídeos de 4-6, 14 e 18KDa. Os valores alcançados neste experimento indicam que os peptídeos com peso molecular de 4-6, 14 e 18KDa, podem ser considerados importantes no diagnóstico da cisticercose bovina. Observaram-se baixos valores de sensibilidade do imunoblot quando se consideraram soros de animais com infecção natural, geralmente discreta. Por outro lado, as altas taxas de desempenho demonstradas no reconhecimento dos peptídeos de 4-6, 14 e 18KDa, pelos anticorpos presentes nas amostras de soros dos bovinos estudados, caracterizam qualitativamente o teste, tornando-o útil no diagnóstico da cisticercose.

ABSTRACT

GIROTTO, Aline, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007. **Evaluation of the immunoblotting for the bovine cysticercosis diagnosis.** Adviser: Paulo Sérgio de Arruda Pinto. Co-adviser: Luís Augusto Nero and Sérgio Oliveira de Paula

The bovine cisticercosis is an illness caused by the larva of *Taenia saginata* called *Cysticercus bovis*. Recently the implementation of immunologic tests has been suggested as alternative for the diagnosis of the illness, amongst these tests the Immunoblotting, that basically detect antibodies in the serum. The present work objectives the evaluation of the Immunoblotting performance in the immunodiagnosis of bovine cisticercosis as well as of *Taenia saginata* and *Taenia crassiceps* antigens. The *Taenia saginata* antigens (Tsag) was gotten from the calves through the experimental infection and the *Taenia crassiceps* (LVcra and Tcra) antigen was gotten through experimental infection in mice balb/c. The antigens had been tested in four groups of Immunoblot control-serum: 28 samples of animals experimentally infected, 32 from naturally infected animals, 28 samples without illnesses and 19 samples with other pathologies. The peptides that had only reacted with the positive serum had been selected and identified as important, observing the localization criteria (molecular weight) as well as its physical appearance, particularly the color intensity. Related to these characteristics, valid for three tested antigens, the bands of 4-6, 14 and 18KDa had been distinguished between the others, showing the highest taxes of performance and a differentiated profile, with bigger area and height, similar to a spot. The 4-6KDa peptides presented the taxes of 66.7, 66.7 and 50% of sensitivity and 97.5, 84.6 and 96.2% of specificity when used the LVcra, Tcra and Tsag antigens, respectively. The 14KDa peptide presented 87.5, 87.5 and 77.8% of sensitivity and 97.5 94.9 and 100% of specificity with the LVcra, Tcra and Tsag antigens, respectively. The 18KDa peptide presented for LVcra, Tcra and Tsag, respectively, 75, 41.7 and 88.9% sensitivity values and 97.5, 89.7 and 92.3% of specificity. Crossed reactions with other illnesses between the three antigenic preparations and the 4-6, 14 and 18KDa peptides had not been observed. The values reached in this experiment indicate that the peptides with molecular weight of 4-6, 14 and 18KDa, can be considered important in the diagnosis of bovine cisticercosis. Low sensitivity values of Immunoblot had been observed when serum of animals with natural infection, generally discrete, had been considered. On the other hand, serum samples of antibodies from the studied bovines demonstrated high taxes of performance in the recognition of the 4-6, 14 and 18 Kda peptides, what characterize the test qualitatively, becoming it useful for the diagnosis of cisticercosis, as well as teste antigens.

1. INTRODUÇÃO

O complexo teníase-cisticercose tem sido considerado uma zoonose reemergente no Brasil, sendo uma das infecções mais difundidas em todos os continentes. Além dos prejuízos econômicos que acarreta, a cisticercose representa um fator de risco à Saúde Pública (QUEIROZ, 2000).

Das conseqüências relacionadas à saúde humana, a neurocisticercose deve ser considerada pela grande representatividade entre as patologias inflamatórias do sistema nervoso central, que pode levar à morte e à forma intra-ocular, que pode levar à cegueira. A *causa-mortis* de pacientes com sintomas neurológicos autopsiados não raramente tem sido a cisticercose. Além disso, a doença tem um impacto sócio-econômico significativo, tanto pela inaptidão temporária ou permanente que ocasiona em indivíduos em idade produtiva, quanto pelo seu alto custo em relação ao diagnóstico e tratamento (GUSSO et al., 1999).

O Brasil possui situação privilegiada no cenário da bovinocultura, apresentando-se como detentor do maior rebanho comercial do mundo, com aproximadamente 161 milhões de cabeças e uma produção de 7,6 milhões de toneladas de carcaça por ano. Atualmente, o país está no topo do ranking dos países exportadores de carne bovina, possuindo todas as condições para o setor das indústrias de carne e derivados alcançar maior participação no

mercado internacional (ANUALPEC, 2007). Para acompanhar esse crescimento e buscar cotas maiores nos mercados interno e externo, os estabelecimentos processadores de carne estão cada vez mais investindo em qualidade e quantidade. No entanto, no Brasil ainda são preocupantes as prevalências de determinadas enfermidades como a cisticercose bovina, causando prejuízos econômicos e sanitários na cadeia produtiva da carne.

De acordo com os resultados observados por diversos autores, a prevalência de cisticercose bovina no Brasil, em frigoríficos varia entre 0,7% a 5,3% (SCHEN et al., 2002; TORRES et al., 2002).

Dados sobre a prevalência da cisticercose são coletados e analisados pelos serviços de inspeção em matadouros, a partir do exame anátomo-patológico realizado nas carcaças, sendo esta a única fonte de dados para determinação de ocorrência de cisticercose (SOUZA et al., 1997). Na maioria dos países, especialmente naqueles em desenvolvimento, a infecção é freqüentemente subestimada pela dificuldade no diagnóstico clínico. Além disso, o conhecimento da prevalência da doença, tanto no homem quanto nos animais, é deficiente devido à falta de dados sistemáticos e comparáveis (OPS, 1983).

Neste contexto, o diagnóstico da cisticercose bovina realizado através da inspeção *post-mortem*, apresenta certas limitações, apesar de ser uma importante medida para auxiliar no controle do complexo teníase-cisticercose. Ainda que a inspeção seja realizada de forma cuidadosa, muitos casos positivos podem passar despercebidos, principalmente naqueles onde a infecção é moderada, que no caso da cisticercose bovina é freqüente (UNGAR E GERMANO, 1991; RODRIGUES et al., 1993). Por razões de natureza estética e comercial, o inspetor normalmente não retalha todos os órgãos, vísceras e carcaças submetidas à inspeção de rotina ou posteriormente a ela. Buscando minimizar essas falhas e sugerir uma proposta de diagnóstico da cisticercose bovina, Monteiro et al.

(2006) através do ELISA, analisaram soros de bovinos experimentalmente e naturalmente infectados com ovos de *Taenia saginata* e verificaram que o teste não foi favorável à detecção de anticorpos no soro de bovinos naturalmente infectados. Entretanto, observaram que o antígeno heterólogo de *Taenia crassiceps* apresentou bons índices de sensibilidade e especificidade.

A similaridade antigênica entre *Taenia solium*, *Taenia saginata* e *Taenia crassiceps*, tem sido descrita por diversos autores, o que tem permitido o uso da última como fonte antigênica alternativa para o diagnóstico da cisticercose humana e animal (PARDINI et al., 2002; MONTEIRO et al., 2006). No entanto, deve-se ressaltar a escassa quantidade de publicações que descrevam o uso do imunoblot com a finalidade de se diagnosticar a cisticercose bovina e que permitem avaliar as variações possíveis quando se emprega antígeno de *Taenia saginata* e *Taenia crassiceps* nas diversas metodologias imunológicas.

Desta forma, dada à importância da cisticercose em saúde pública e o fato de que muitos casos positivos não são detectados na inspeção *post-mortem*, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas adicionais que explorem a produção de antígenos heterólogos (cisticercos de *Taenia crassiceps*), e a utilização destes em testes diagnósticos da doença, visando reduzir o risco a saúde humana e minimizar os prejuízos relacionados à exploração pecuária.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma proposta de diagnóstico da cisticercose bovina pelo imunoblot, utilizando diferentes extratos antigênicos de cisticercos de *Taenia saginata* e *Taenia crassiceps*, com os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar as reações imunológicas pelo imunoblot nos soros dos bovinos positivos e negativos para cisticercose, em um protocolo de padronização previamente testado;
- Determinar o peso molecular e definir a importância diagnóstica dos peptídeos detectados no teste;
- Analisar o comportamento dos antígenos total de cisticercos de *Taenia saginata* (Tsag) e antígenos total (Tcra) e vesicular (LVcra) de cisticercos de *Taenia crassiceps* frente a soros-controle negativos e positivos para cisticercose e soros com outras enfermidades em bovinos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico e importância econômica da cisticercose

A cisticercose foi observada pela primeira vez em humanos no século XVI, entretanto a natureza dessa helmintíase ficou desconhecida até a segunda metade do século XIX, quando pesquisadores alemães demonstraram que a forma larvária da *Taenia solium* era responsável por desenvolver a cisticercose em animais e humanos (DEL BRUTTO E SOTELLO., 1988). Baseando-se em descrições sobre as tênia em trabalhos da antiguidade, considerando hábitos alimentares dos povos e ainda os conhecimentos atuais sobre a epidemiologia e história natural dos agentes, Foster (1965), concluiu que as espécies de tênia prevalentes nos povos que viviam às margens do Mar Mediterrâneo eram a *Taenia saginata* e a *Taenia solium*.

A distinção entre as duas espécies foi feita primeiramente por Goeze (1782), citado por Santos (1982). Leuckart, em 1861, utilizando proglotes grávidas, infectou bovinos adultos, que desenvolveram posteriormente a cisticercose. Descobriu-se então o *Cysticercus bovis*, forma larvária da *Taenia saginata*.

Em frigoríficos brasileiros, o julgamento de animais com cisticercose pode gerar vários custos adicionais e prejuízos, inclusive para produtores. Para verificação e controle, os procedimentos adotados são: o seqüestro durante período mínimo de 15 dias de

carcaças parasitadas, o tratamento sanitário aplicado às mesmas para destruição dos cistos, que pode ser por temperatura (calor ou frio) ou por ação química (salga). Ainda pode ocorrer impedimento em exportar as carcaças parasitadas, custos com mão de obra, eletricidade, vapor, perda total das carcaças por ocasião de infecções maciças e até mesmo a recusa dos frigoríficos em comprar animais de propriedades infectadas.

Quando são encontrados cistos vivos apenas nas vísceras, as carcaças são destinadas ao tratamento pelo frio (15 dias em câmara de congelamento a -18°C), sendo necessários pelo menos 2 dias para o congelamento total. Nessa condição o produto é comercializado com deságio de 20% no valor do traseiro com osso e de 15% no valor do dianteiro com osso. Quando os cistos são encontrados na carcaça, ela é destinada à conserva (carne do tipo indústria, imprópria para o consumo humano *in natura*), apresentando deságio de cerca de 65% (QUEIROZ et al., 2000; MIRANDA, 2002).

Segundo os mesmos autores, para um abate mensal de 12.000 cabeças e um índice médio de 1,5% de carcaças congeladas, o prejuízo pode chegar a R\$ 232.000,00.

As perdas econômicas pelas condenações de carcaças bovinas e suínas infectadas por cisticercos são consideráveis. Na América do Sul, estas perdas são da ordem de 420 milhões de dólares anuais (MIRANDA, 2002).

3.2. Aspectos biológicos da *Taenia saginata*

O parasita pertence ao filo Platyhelminthes, classe Cestoda, ordem Cyclophyllidea, família Taeniidae, gênero *Taenia*, espécie *saginata* (NCBI, 2007). *Taenia saginata* é um cestóide plano em forma de cinta, de cor esbranquiçada, que pode medir de 4 a 25m de comprimento. Habita o intestino delgado do homem, vivendo preso a ele por meio de um escólex piriforme de 1 a 2 mm, formado por quatro ventosas de 0,5 a 0,8 mm de diâmetro, não possuindo rostelo nem ganchos (NEVES, 2005). Consta de uma cabeça ou escólex,

seguida de uma porção chamada zona germinativa, que dá origem a um conjunto de segmentos ou proglotes, formando o estróbilo (NASCIMENTO, 1991).

As proglotes mais próximas da zona germinativa são as imaturas, seguidas pelas maduras, nas quais estão presentes os órgãos reprodutores masculinos e femininos bem diferenciados. Cada proglote é uma unidade independente produtora de ovos que contém embriões infectantes. As mais distais são as grávidas, presentes nos ramos uterinos. Cada proglote pode conter até 100.000 ovos, e habitualmente se desprende do estróbilo em cadeias curtas e são eliminadas com as fezes (UNGAR et al., 2001).

Os ovos de *Taenia saginata*, medem de 46 a 50 por 39 a 41 μm , e possuem uma membrana estriada radialmente, chamada embrióforo, que secreta queratina e circunda a oncosfera ou embrião hexacanto (URQUHART et al., 1990).

A forma larvária (cisticerco) da *Taenia saginata*, *Cysticercus bovis*, tem a forma de uma vesícula semitransparente com cerca de 15 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, possui líquido vesicular e um escólex invaginado em seu interior (PESSOA E MARTINS, 1982). O líquido vesicular por sua vez é composto por água, sais minerais, proteínas, uréia, creatina, ácido úrico, glicose e traços de colesterol (SPINA-FRANÇA, 1976).

O metacestóide ou cisticerco quando ingerido pelo hospedeiro definitivo fixa-se à mucosa pelo escólex invaginado e passa a se desenvolver até chegar à fase adulta durante cerca de três meses. O verme adulto se aloja no intestino delgado do homem, formando uma cadeia de proglotes atingindo assim o fim do desenvolvimento. Estas se desprendem do estróbilo (apólise), por ruptura ao longo dos sulcos que marcam os limites entre elas. As proglotes destacam-se geralmente uma a uma, sendo eliminadas ativamente graças à sua robusta musculatura, ou através das fezes (NEVES, 2005).

Em geral as proglotes se rompem no meio externo por efeito da contração

muscular ou da decomposição de suas estruturas, liberando assim os ovos no solo. A ingestão de ovos maduros pelo hospedeiro intermediário é indispensável para a instalação da infecção por cisticercose (ACHA E SZYFRES, 1986; ALUJA et al., 1987; CÔRTEZ, 2000; REY, 2001; NEVES, 2005). Ao atingir o estômago e o intestino, a ação combinada do suco gástrico e da pepsina inicia um processo de digestão do embrióforo, que se completa com a intervenção da pepsina pancreática. Nesta fase ocorre a ativação do embrião hexacanto pela ação conjunta da bile e tripsina (CÔRTEZ, 2000). Uma vez liberado, o embrião insinua-se pelas estruturas anatômicas da mucosa intestinal, ganha a circulação sanguínea, sendo então transportado passivamente até a sede de sua localização definitiva, onde evolui até a formação do cisticerco. O *Cysticercus bovis* apresenta predileção por diferentes órgãos e tecidos que apresentem irrigação intensa devido à maior atividade funcional como músculos esquelético e cardíaco. (ABDUSSALAM, 1975; ACHA E SZYFRES, 1986; ALUJA et al., 1987; PATHAK, 1989; CÔRTEZ, 2000; REY, 2001).

Os primeiros estágios macroscopicamente visíveis podem ser detectados nos músculos por volta de 6 a 12 dias após a infecção e alcançam estrutura vesicular característica em aproximadamente 6 semanas. No entanto, cisticerco somente estará completamente maduro em 60 a 75 dias após a infecção, permanecendo viável no músculo por alguns meses (ALUJA et al., 1987; PATHAK, 1989; REY, 2001).

3.3. Aspectos epidemiológicos

3.3.1. Características epidemiológicas do complexo teníase-cisticercose

O complexo teníase-cisticercose é uma zoonose, que engloba, na realidade, duas doenças distintas, com sintomatologia e epidemiologia diferentes: a teníase, fase final do ciclo do parasita, presente apenas no homem, e a cisticercose, estágio larval da *Taenia saginata*, que acomete bovinos, ou da *Taenia solium*, que acomete suínos e humanos.

O homem é o único hospedeiro definitivo da forma adulta tanto da *Taenia saginata* quanto da *Taenia solium* (UNGAR et al., 2001). Ao alimentar-se com carne suína ou bovina contendo cisticercos, crua ou mal cozida, o homem adquire a teníase (NASCIMENTO, 1991). Após a ingestão da larva, em aproximadamente três meses, já se tem o parasita adulto no intestino delgado. Quando evacua em local inapropriado, o ser humano contamina o meio ambiente com ovos eliminados nas fezes. O suíno ou o bovino ao ingerirem fezes humanas (direta ou indiretamente) contendo ovos de *Taenia solium* ou *Taenia saginata*, respectivamente, adquirem a cisticercose. Ainda, o esgoto não tratado é uma importante via de transmissão da doença, principalmente devido ao seu uso como fertilizante em pastagens ou mesmo quando contamina fontes de água de dos animais, podendo causar surtos de cisticercose em criações (ILSOE et al., 1990; KYVSGAARD et al., 1991).

A cisticercose humana é transmitida através do consumo de alimentos crus mal lavados, ingestão de ovos embrionados com a água de bebida, ou ainda, pela auto-infecção, decorrente de maus hábitos de higiene (SANTOS, 1996). O período de incubação para a cisticercose humana pode variar de 15 dias a muitos anos após a infecção. Os ovos de *Taenia solium* e de *Taenia saginata* podem permanecer viáveis por vários meses no meio ambiente, principalmente em presença de umidade (ILSOE et al., 1990)

A ocorrência do complexo teníase-cisticercose no homem é diretamente influenciada por hábitos de natureza alimentar e por princípios de higiene. Os principais

fatores que favorecem a contaminação do meio ambiente pelos ovos, abrangem a higiene pessoal deficiente, a precariedade das condições sanitárias e o baixo nível sócio-econômico-cultural da população (UNGAR E GERMANO, 1991; FUNASA, 2007).

3.3.2. Prevalência da cisticercose bovina

A cisticercose bovina é a zoonose parasitária mais freqüentemente diagnosticada em matadouros frigoríficos, sendo a principal causa de condenações, seqüestros e aproveitamentos condicionais de carcaças, acarretando grandes prejuízos tanto ao produtor quanto ao frigorífico (UNGAR et al., 2001).

Dados obtidos nos matadouros, através da inspeção sanitária, são importantes para se traçar a prevalência e a evolução dessa doença. Para isso é fundamental o conhecimento da origem do lote, observando-se os locais de criação e terminação e não apenas a localidade (MIRANDA, 2002).

Santos (1993) alerta que as várias taxas de prevalência da cisticercose bovina registradas no país não são consideradas como um todo, pois a maioria dos dados estão diluídos e não refletem exatamente a realidade nacional. Ainda, variações de prevalências observadas da parasitose entre os animais de uma determinada região poderiam ser justificadas pela deficiência e/ou falta de padronização na aplicação das técnicas de inspeção *post-mortem* adotadas pelas equipes de fiscalização sanitária nos matadouros.

A prevalência de cisticercose poderia ser maior, se os números originários do abate clandestino fossem considerados (MIRANDA, 2002). Acredita-se que, com a instalação do serviço de Inspeção Municipal, um grande contingente de animais que antes eram

levados ao abate clandestino, sofra fiscalização (ALMEIDA et al., 2002), permitindo uma melhor estimativa da prevalência da doença.

Segundo Calil (1984), o número de casos de cisticercose em estabelecimentos sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF) no estado de São Paulo, entre 1980 e 1983, representou 4,02% dos bovinos abatidos, concordando com Barra e Ferreira (1984), que verificaram a mesma frequência em fevereiro de 1983.

Em estudo de prevalência realizado por Ungar e Germano (1992), a partir de dados do abate bovino fornecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em Ribeirão Preto, em SP, a cisticercose apresenta prevalência de 6,34%, em Bauru 7,39% e em Marília 7,98%.

No estado de São Paulo, Ungar & Germano (1992), relataram que de um total de 896.654 bovinos abatidos sob inspeção do SIF, foram encontrados 48.957 casos de cisticercose bovina, correspondendo a uma prevalência de 5,5%, enquanto para outros Estados estimaram que esta prevalência estivesse entre 0,7 e 5,3%. Moreira et al. (2002), realizaram o controle do abate de 10.679 bovinos em 41 municípios do Estado de Minas Gerais, e observaram 473 animais (4,43%) com cisticercose.

No município de Tupã, SP, no ano de 1992, em estabelecimento sob inspeção federal, a prevalência da cisticercose bovina foi de 12,5%. No ano seguinte, a prevalência observada para o mesmo estabelecimento foi de 10,7% (MANHOSO, 1996).

Segundo Santos (1996), a prevalência da cisticercose bovina variava no Brasil entre 4 a 6%, e a suína entre 0,5 a 1,0% nos estabelecimentos registrados no SIF. O mesmo autor ressalta que a prevalência da cisticercose bovina em propriedades rurais chegou a atingir índices superiores a 10%.

Segundo Queiroz et al. (2000), entre 1993 e 1997, a cisticercose constituiu a principal causa de condenação de bovinos em matadouros de Minas Gerais, registrando uma prevalência de 0,32-6,86%.

Avanços tecnológicos na suinocultura diminuíram gradativamente a prevalência da cisticercose suína, porém, os registros do diagnóstico da neurocisticercose humana e da cisticercose bovina vêm aumentando (SANTOS, 1996; QUEIROZ et al., 2000; PAIVA, 2007).

3.4. Resposta humoral de bovinos com cisticercose

Em modelos experimentais foram identificados vários mecanismos utilizados pelo cisticerco, para modular a resposta imune e inflamatória. O parasita secreta um inibidor de serina proteinase, também chamada de taeniaestatina, que inibe a ativação do complemento, de linfócitos e a produção de citocinas. A superfície do parasita é recoberta por uma camada de polissacarídeo, que afasta a ativação do complemento da parede do cisto. A paramiosina presente no parasita também inibe a via clássica de ativação do complemento. O parasita produz prostaglandinas e proteínas de baixo peso molecular, que diminuem a inflamação e alteram a produção de citocinas nos linfócitos T auxiliares 2 (Th2). O cisticerco secreta proteases que podem degradar interleucinas (IL2) e imunoglobulinas. Os cisticercos viáveis estimulam a produção de imunoglobulinas, que paradoxalmente aumentam o tamanho do cisto e degradam aminoácidos (WHITE, 2000).

De acordo com o mesmo autor, quando o cisticerco está morrendo a resposta inflamatória é composta primariamente por linfócitos, porém observa-se a participação de neutrófilos e eosinófilos. Nos estágios iniciais da morte do parasita, ocorre a estimulação

de citocinas produzidas por linfócitos T auxiliares 1 (Th1), Interferon Gama e Interleucina 2.

PAWLOWSKI (1982), pelo teste de precipitação em gel, detectou anticorpos aos dois meses, após a infecção experimental de bezerros, permanecendo a reação fortemente até os 3-6 meses. Entretanto não encontrou reação evidente em casos de infecções leves. Segundo o mesmo autor, a resposta imunológica de animais mais novos é menor quando comparada a resposta de animais mais velhos.

Harrison e Sewell (1981), em teste de hemaglutinação indireta, detectaram anticorpos duas a seis semanas após a infecção oral com ovos de *Taenia saginata* em bovinos com três meses a um ano de idade.

Minozzo et al. (2004), através do teste imunoenzimático (ELISA) verificaram que, após a infecção com ovos de *Taenia saginata*, os animais passaram a produzir anticorpos contra o referido parasito. O aumento da produção de IgG em bezerros infectados coincide com os observados por Harrison e Sewell (1981), Gallie e Sewell (1981), Kamanga-Sollo et al., (1987), Kyvsgaard et al., (1991), Smith et al., (1991) e Hayung et al. (1991).

Brandt et al. (1992) detectaram anticorpos na 6ª semana pós-infecção, com um nível crescente até 20ª semana, quando realizaram o abate dos animais. Emre (1997) detectou resposta de anticorpos 4 semanas após a infecção quando os animais albergavam mais de 100 cisticercos vivos.

3.5. Diagnóstico e controle de bovinos com cisticercose

A inspeção de carnes realizada em matadouros possibilita o diagnóstico da cisticercose através de exame "*post mortem*" (UNGAR et al., 2001). Rotineiramente o diagnóstico da cisticercose bovina é baseado na inspeção das carcaças e vísceras, de

acordo com o artigo 176 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1997), após cortes específicos. Nesse exame, são realizadas incisões na musculatura e em órgãos onde os cistos são encontrados com maior frequência e o diagnóstico se faz através da visualização macroscópica dos mesmos (OPS, 1983; GEMMELL et al., 1983). A predileção do cisticerco por essas áreas está relacionada com o maior aporte sanguíneo, levando a um rico suprimento de mioglobina e taxas respiratórias mais elevadas (ALUJA et al., 1987; PATHAK, 1989; REY, 2001).

Ainda que seja realizada de forma cuidadosa, segundo Acha e Szifres (1986) e Fukuda et al. (1998), a inspeção *post mortem* baseada em cortes nos tecidos de preferência é pouco eficaz, e em muitos casos de infecção leve pode não detectar os cisticercos, pois, por razões de natureza estética e comercial, o inspetor normalmente não retalha todos os órgãos, vísceras e carcaças submetidas à inspeção de rotina. Este fato é confirmado por Santos (1993), que comparou o número de cisticercos detectados pelos procedimentos normais de rotina, com o número de cisticercos evidenciados por minucioso fatiamento dessas mesmas porções e de outras não rotineiramente examinadas em carcaças. Constatou-se que nos procedimentos normais de rotina de inspeção não foi possível detectar de 26,0 a 56,7% dos animais infectados em relação aos casos pesquisados. Neste contexto, Abdussalam (1974), Walter e Koske (1980), Santos (1993) enfatizam que quanto mais leve o grau de infecção, maior a possibilidade de não detecção de cisticercos pelos procedimentos normais de rotina de inspeção.

Apesar dessa limitação, na maioria dos países a inspeção de carnes é a única medida rotineiramente aplicada no controle e prevenção do complexo teníase - cisticercose (WALTER E KOSKE, 1980; PAWLOWSKI, 1982; OPS, 1983; GRACEY E COLLINS, 1986; FUKUDA et al. 1998; UNGAR et al., 2001).

Com relação aos critérios de julgamento e destinação de carcaças acometidas pela cisticercose, a Legislação Brasileira (BRASIL, 1997) prevê, após cuidadoso exame da rotina de inspeção, basicamente 3 destinos: liberação, condenação e aproveitamento condicional. No último caso, carcaças com cisticercos podem ser tratadas através do frio, salga e pelo calor, com intuito de eliminar a possibilidade de transmissão da teníase e também reduzir as perdas econômicas pela condenação (BRASIL, 1997; RODRIGUES, 1993). A condenação total é indicada para casos de infecções generalizadas. A liberação da carcaça *in natura* é prevista quando for encontrado um único cisto calcificado, após a sua excisão. Nos casos de infecção moderada ou localizada, as carcaças e órgãos afetados podem ser aproveitados, após serem submetidos a um dos seguintes tratamentos: pelo frio (-18° C por 15 dias), pelo calor (à temperatura mínima de 60° C) e pela salga (OPS, 1983; NASCIMENTO, 1991).

Devido as limitações do exame anatomo-patológico na detecção de carcaças parasitadas, existe a necessidade urgente do desenvolvimento e implementação de métodos diagnósticos auxiliares, que poderiam servir como alternativa ou aperfeiçoamento da inspeção nos matadouros, em investigações epidemiológicas ou na rastreabilidade deste agente patogênico através de exames em animais vivos (QUEIROZ et al., 2000; MINOZZO et al., 2004). Neste propósito alguns métodos imunológicos vem sendo indicados.

3.6. Diagnóstico imunológico da cisticercose bovina

3.6.1. Antígenos empregados no imunodiagnóstico

Em virtude da dificuldade de obtenção de cisticercos nas carcaças de bovinos infectados, um recurso utilizado é o uso de formulações antigênicas de espécies heterólogas, as quais vêm possibilitando a obtenção de bons resultados a partir da observação da existência de antígenos comuns entre espécies diferentes de tênias (ROSSI et al., 2000; MONTEIRO et al., 2006). De acordo com Bueno et al. (2000), em trabalhos de caracterização de antígenos de cisticercos de *Taenia crassiceps*, observaram que parte dos antígenos comuns entre *Taenia crassiceps* e *Taenia solium* são glicoproteínas que podem ser úteis no imunodiagnóstico da cisticercose.

A *Taenia crassiceps* é um cestóideo de raposas, isolada em 1962 no Canadá. Posteriormente foram descritas infecções naturais e experimentais obtendo a forma larvária, denominada *Cysticercus longicollis*, que é encontrada em roedores. Por meio de sucessivas inoculações em camundongos via intraperitoneal, isolou-se a cepa ORF, que tem a capacidade de reproduzir-se assexuadamente por brotamentos exógenos (LARRALDE, 1989; BUENO et al., 2000).

Diversos trabalhos enfatizam a facilidade de manutenção e obtenção do parasita em condições de laboratório, além de evidenciarem resultados favoráveis à utilização e desempenho destes antígenos em testes imunológicos com cisticercose suína e bovina, podendo assim solucionar o problema da disponibilidade e quantidade de antígenos (ROSSI et al., 2000; PARDINI et al., 2002; MACEDO et al., 2002; ARRUDA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2006; SUZUKI et al., 2007))

A obtenção e utilização de antígenos alternativos, recombinantes e peptídeos sintéticos pode ser um avanço em relação a fonte de antígenos e para implementar a eficiência tanto dos testes diagnósticos, aplicados em amostras de soros humanos e bovinos, quanto na eficiência de vacinas para cisticercose (TOLEDO et al., 1999)

3.6.2. Métodos imunológicos

A frequência elevada da cisticercose humana e a severidade das manifestações neurológicas que ocorrem nestas condições, indicam a importância do complexo teníase–cisticercose, justificando a aplicação de métodos eficazes no diagnóstico e no controle destas doenças no homem e nos animais (COSTA-CRUZ et al., 1995).

Os métodos imunológicos a serem empregados no diagnóstico de qualquer patologia devem apresentar alta sensibilidade e especificidade, valendo-se da utilização de reagentes estáveis, além de serem práticos e econômicos. Em trabalhos epidemiológicos feitos em países em desenvolvimento com alta prevalência de helmintoses, testes com alta especificidade são de grande importância. (GONZALEZ et al., 1990).

Os métodos imunológicos de diagnóstico da cisticercose mais utilizados na última década são os testes ELISA e Imunoblot. (GONZALEZ et al., 1990; PINTO et al., 2000).

O teste ELISA tem sido largamente empregado no diagnóstico de diferentes patologias, incluindo a cisticercose, apresentando alta sensibilidade e especificidade, além de boa reprodutibilidade (PIALARISSI et al., 1987; KUMAR E GAUR, 1987; MINOZZO et al., 2004; SUZUKI et al., 2007; NETTO et al., 2007). Porém, imunoblot para o diagnóstico da cisticercose humana tem apresentado sensibilidade e especificidade superiores às encontradas no ELISA, demonstrando ser um importante método para o diagnóstico da infecção pela *Taenia solium*, (TSANG et al., 1991; PATHAK et al., 1994; ITO et al., 1999; BRAGAZZA et al., 2002; MACEDO et al., 2002) sendo ainda incipiente o seu emprego no diagnóstico da *Taenia saginata*.

No imunoblot, os antígenos estão disponíveis em partes, peptídeos de alto e baixo valor diagnóstico, possibilitando reações individuais com diferentes isótipos de anticorpos

e no ELISA estes peptídeos só estão disponíveis em mistura, inviabilizando a separação entre as reações específicas e inespecíficas (DIAZ et al., 1992).

Embora pesquisas que explorem o uso do imunoblot no diagnóstico da cisticercose bovina ainda sejam escassas, a técnica já vem sendo utilizada com sucesso no diagnóstico da cisticercose suína e humana (PINTO et al., 2001; SATO et al., 2003).

Gottstein et al. (1987), concordando com os achados de Diaz et al. (1992) em relação à superioridade do imunoblot sobre o ELISA no diagnóstico da cisticercose humana, verificaram 92% de sensibilidade e 100% de especificidade quando utilizaram os isótipo anti-26 KDa ou anti- 8 KDa com o critério no diagnóstico.

Tsang et al. (1989), empregando antígeno de glicoproteínas purificadas no imunoblot para diagnóstico da cisticercose humana, baseando-se na identificação de glicoproteínas específicas (50, 24, 21, 18, 14 e 13 KDa), alcançaram elevados índices de especificidade, valores semelhantes aos encontrados por Gonzalez et al. (1990) para o diagnóstico da cisticercose suína.

Diaz et al. (1992) e Montenegro et al. (1994) também consideram as glicoproteínas com peso molecular de 50, 42 – 39, 24, 21,18 14 e 13 KDa como específicas no diagnóstico da cisticercose humana pelo teste do imunoblot.

Em ensaios de Pathak et al. (1994) o imunoblot se comportou como um teste útil no diagnóstico *ante-mortem* da cisticercose suína. Quatro bandas antigênicas de baixo peso molecular (8, 11,16 e 23 KDa) reconheceram 90% dos soros positivos sem acusar reação cruzada com outras patologias.

Gottstein et al. (1986) usando o extrato antígeno de *Taenia solium* no teste de imunoblot para o diagnóstico de cisticercose humana, reportou boa sensibilidade e especificidade em relação a moléculas de 8 e 26 KDa. Larralde et al. (1989) detectaram bandas similares no reconhecimento de pessoas positivas a cisticercose.

Rodriguez-Canul et al. (1997) descreveram que as proteínas de 7 ou 8 KDa de *Taenia solium* possuem propriedades diagnósticas, da cisticercose humana, similares as encontradas com proteínas de 10KDa.

Rossi et al. (2000), avaliando diferentes extratos antigênicos de *Taenia solium* e de *Taenia crassiceps* na detecção de anticorpos em pacientes com neurocisticercose, obtiveram resultados excelentes com extratos da *Taenia crassiceps*, que mostrou ser sensível e específico, reconhecendo com maior frequência a banda de 18 KDa, no soro e líquido cefalorraquidiano. Neste mesmo estudo, comparando o ELISA com o imunoblot, observaram que o imunoblot é melhor por sua alta sensibilidade (100%) e especificidade (100%) para a detecção de anticorpos, concordando com a observação de outros autores (DIAZ et al., 1992; TERRAZAS et al., 1994; SCHANTZ et al., 1994).

Simac et al. (1995), também reportaram que as proteínas de 13 e 14 KDa de *Cysticercus cellulosae* tem uma elevada reatividade imunológica com soros e líquido cefalorraquidiano, as quais foram consideradas como marcadores potenciais da cisticercose cerebral ativa.

Vaz et al. (1997) observaram a imunodominância das proteínas de 72, 62 e 42 KDa quando utilizaram o antígeno de membrana de *Taenia crassiceps* e 72-68, 95-92 KDa quando utilizaram o antígeno de líquido vesicular no diagnóstico cisticercose cerebral humana.

Shiguekawa et al. (2000) consideraram as proteínas de 24, 39-42, 47-52, 56, 64-68, 126-155 KDa do antígeno total de *Taenia solium* e 18, 24, 26-28, 32-36, 47-52 e 75 do antígeno de fluido vesicular como imunodominantes no diagnóstico da neurocisticercose, com altos índices de especificidade.

Pinilla et al. (2003) em análise de soros humanos com neurocisticercose encontraram com maior frequência de reconhecimento as proteínas de 29, 45 e 66 KDa,

resultados semelhantes aos encontrados por Winograde et al. (1999) e EV et al. (1999). Determinaram ainda, para o imunoblot, 79% de sensibilidade e 89% de especificidade.

Macedo et al. (2002), utilizando como antígeno *Taenia solium* e *Taenia crassiceps*, obtiveram para ambos os antígenos sensibilidade de 86% e especificidade de 99% no diagnóstico da neurocisticercose.

Gekeler et al. (2002), com antígeno de *Taenia solium*, obtiveram sensibilidade e especificidade de 81,7% e 94,4% respectivamente, em soros de pacientes com neurocisticercose.

Gottstein et al. (1987) relataram 92% de sensibilidade e 100% de especificidade do Imunoblot no diagnóstico da cisticercose humana.

Oliveira et al. (2007) utilizando antígeno de *Taenia saginata* para o diagnóstico da neurocisticercose obtiveram 85% de sensibilidade e 93,6 de especificidade.

Considerando os dados apresentados, sugere-se que a associação das duas técnicas, ELISA e imunoblot, proporcionariam melhoria no diagnóstico da cisticercose, com importância equivalente em estudos soropidemiológicos, nos quais o ELISA pode ser usado para uma seleção inicial e o imunoblot como teste confirmatório (TSANG et al., 1991).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização dos grupos de soros-controle

Foram utilizados soros de 60 bovinos positivos para cisticercose, 32 bovinos naturalmente infectados e 28 diferentes amostras de 4 animais experimentalmente infectados, além de soros de 28 bovinos sem doenças (soros negativos para cisticercose). Também foram estudadas eventuais reações cruzadas com soros de 19 bovinos portadores de outras patologias (tuberculose, hidatidose, fasciolose, actinomicose, actinobacilose e anaplasnose).

As enfermidades mencionadas, bem como a positividade e negatividade dos animais para a cisticercose foram confirmadas pelo teste de ELISA e pelo exame *post-mortem*, baseado na técnica estabelecida na “Rotina Oficial nas Linhas de Inspeção” do SIF (BRASIL, 1997), considerando o minucioso exame em locais de instalação dos

cisticercos, como língua, coração, diafragma, músculos da mastigação e da carcaça, conforme Santos (1993).

4.2. Preparo do material

4.2.1. Infecção experimental dos bovinos

Quatro animais da raça Holandesa, desmamados e sabidamente negativos para cisticercose, foram inoculados com ovos de *Taenia saginata*, em instalações do hospital veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os ovos foram obtidos de uma paciente com exame de fezes positivo para *Taenia* spp, após tratamento com Niclosamida (Bayer AG, Leverkusen, Germany), 2g em dose única, seguida da administração de purgativo salino após 2 horas. A tênia eliminada foi lavada por várias vezes em solução fisiológica contendo penicilina e estreptomicina, procedendo-se, em seguida, à retirada dos ovos das proglotes, que foram mantidos na mesma solução até o momento da inoculação (VERASTEGUI et al., 2000). Procedeu-se a avaliação morfológica das proglotes. O inóculo foi padronizado em câmara de Neubauer através da contagem dos ovos. Com auxílio de sonda gástrica, cada animal foi inoculado por via oral com cerca de 120.000 ovos (HITO e HASHIMOTO, 1983).

Antes e após a inoculação, os bovinos inoculados foram submetidos a coletas periódicas de aproximadamente 10ml de sangue por meio da veia jugular, em intervalos de 15 dias, até o momento do abate (225 dias). Após centrifugação, o soro foi separado em alíquotas e armazenado em freezer a -20°C .

O aparecimento das reações imunológicas desde o dia da inoculação até o momento do abate foi monitorado através do teste de ELISA.

4.2.2. Obtenção da forma larvária da *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*)

Após insensibilização e sangria dos animais foi realizada a análise dos tecidos, através de finos cortes paralelos. Na cabeça foram dissecados os músculos mastigadores, língua, além de outros músculos. Ainda, foram analisados os músculos das regiões esofágica, cervical, dorsal, ventral e músculos costais, diafragma e dos quartos traseiros e dianteiros. Desta mesma forma, órgãos como o coração, pulmão, rins, baço, pâncreas e fígado foram dissecados e examinados. Os cisticercos encontrados (Figura 1) foram mantidos em solução salina, liofilizados e utilizados em seguida no preparo dos antígenos.



Figura 1. *Cysticercus bovis* (pinça) em coração de bovino portador de infecção generalizada.

4.2.3. Obtenção da forma larvária da *Taenia crassiceps* (*Cysticercus longicollis*)

Os cisticercos utilizados no preparo do antígeno total de larva de *Taenia crassiceps* foram obtidos através de infecção experimental com inoculação intraperitoneal (agulha de

calibre 25x7mm e 0,2ml de PBS (Na_2HPO_4 0,0075M; NaH_2PO_4 0,0025M; NaCl 0,14 - pH 7,2) de 10 parasitas (formas pequenas), em camundongos fêmeas BALB/c de 8-12 semanas.

Após 90 dias, os animais com aumento do volume abdominal foram sacrificados por inalação de éter etílico e sangria, e os parasitas foram retirados cuidadosamente da cavidade peritoneal por meio de compressão do peritônio, sendo eliminados aqueles em fase de degeneração ou calcificação e o restante utilizado em seguida no preparo dos antígenos, evitando a ruptura das vesículas (Figura 2).



Figura 2. Camundongo experimentalmente inoculado apresentando cisticercos intraperitonealmente, após retirada do tecido cutâneo

4.2.4. Preparo do antígeno total de cisticercos de *Taenia crassiceps* (Tcra)

O antígeno foi preparado seguindo as recomendações de Pinto et al. (2001), com algumas modificações.

Os cisticercos foram liofilizados e em seguida triturados em gral para obtenção do pó e adição de de adição de solução salina 0,15M obtendo uma proporção final de 6,5 a 10%. A mistura foi homogeneizada em homogeneizador de Potter, em banho de gelo e centrifugada a 17.400g, á temperatura de 4 °C, durante 30 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado um inibidor de protease PMSF (0,25M – 10µl/ml) e a solução antigênica resultante foi alíquotada e estocada em freezer a -20°C.

4.2.5. Preparo do antígeno vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* (LVcra)

O antígeno LVcra foi preparado através da centrifugação dos cisticercos a 35.000g, á temperatura de 4 °C, durante 30 minutos. Posteriormente, ao sobrenadante foi adicionado um inibidor de protease PMSF (0,25M – 10µl/ml) e a solução antigênica resultante foi alíquotada e estocada em freezer a -20°C.

4.2.6. Preparo do antígeno total de cisticercos de *Taenia saginata* (Tsag)

Para o preparo do antígeno total Tsag, seguiu-se o mesmo procedimento empregado para o preparo dos antígenos Tcra, com atenção especial para a conservação em gelo dos cisticercos durante a sua separação da carne bovina, evitando a incorporação de tecidos musculares.

4.2.7. Dosagem de proteínas

A concentração protéica dos antígenos foi determinada baseada no método do ácido bicinconínico, através do kit Sigma BCA-1 (Sigma, ST Louis, MO, USA).

4.2.8. ELISA

O teste ELISA foi desenvolvido com o propósito de acompanhar a evolução da resposta imune dos bezerros inoculados com ovos de *Taenia saginata* e definir o grupo de soros-controle experimentalmente positivos, na impossibilidade de realização do exame anátomo-patológico.

Baseando-se nos testes realizados por Monteiro et al. (2006), as placas de poliestireno (Corning, Merse, Campinas – SP, Brasil) foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6 durante 12 horas a 4°C, antecedidas por incubação à temperatura ambiente durante uma hora. Após lavagens 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, foram adicionados os conjugados, anti-IgG de bovino A-7414 marcado com peroxidase¹ e repetidos os procedimentos de incubação e lavagem. A reação foi revelada com solução de OPD (0,1%) e H₂O₂ 0,003% em tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, durante um período de incubação de 5 minutos. A reação foi bloqueada com H₂SO₄ 4N. As leituras realizadas em espectrofotômetro próprio (leitor de ELISA) em comprimento de onda de 492nm . A quantidade de reagentes aplicados à placa se manteve em 100µl, exceto para a

¹ Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA.

solução bloqueadora, que foi de 200µl. As concentrações dos antígenos, as diluições dos soros e do conjugado utilizados foram as estabelecidas por Monteiro (2006) durante a padronização do teste ELISA indireto para diagnóstico da cisticercose bovina.

4.3. Ensaio de padronização

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

4.3.1.1. Técnica básica

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para separação das proteínas dos antígenos, foi realizada em sistema descontínuo segundo Laemmli (1970), em aparelho comercial Mini Protean II². As amostras de antígenos, diluídas em solução tampão de amostra (Trizma 60mM pH6,8; SDS 2%; glicerol 25%; 2-mercaptoetanol 14,4mM e azul de bromofenol 0,1%) e submetidas a aquecimento em banho maria a 100°C por 5 minutos imediatamente antes da aplicação, foram aplicadas (50µl) lado-a-lado em "poços" feitos no topo do gel de empilhamento a 5% (Tris-HCl 0,5M pH6,8, contendo 0,025% de SDS) e separadas, de acordo com seu peso molecular, em gel gradiente de 5 e 20% (solução tamponada Tris-HCl 1,5 pH 8,8, contendo 0,025% de SDS), obtido através de um sistema de vasos comunicantes. Uma das raias foi reservada para o marcador, uma mistura disponível comercialmente de proteínas de pesos moleculares conhecidos³ (6,5 a 205KDa). As corridas eletroforéticas em solução tampão de corrida (Trizma 25mM; glicina 192mM; SDS 0,1%; pH 8,3) foram submetidas a uma voltagem de

² Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA.

³ M4038 Sigma Chemical Co., Louis, MO, USA

100V, migrando em direção ao ânodo, até a chegada do azul de bromofenol no final do gel (aproximadamente 3 horas).

4.3.1.2. Padronização

As concentrações de géis testadas foram 5, 10, 12, 15, 20 e 25% e as concentrações de géis de gradiente foram 5 e 20, 10 e 20, 5 e 25, 10 e 25 e 5 e 30% .

Em cada corrida eletroforética optou-se em se utilizar 30µg de cada antígeno e 10µl de padrão de peso molecular (PM). O volume utilizado para os três antígenos foi o mesmo, porém a concentração do antígeno de *Taenia saginata* foi o dobro da concentração dos antígenos de *Taenia crassiceps*. Os antígenos foram colocados lado a lado sempre na mesma ordem, sendo o padrão de peso molecular colocado entre os antígenos LVcra e Tsag, como consta na figura 3.

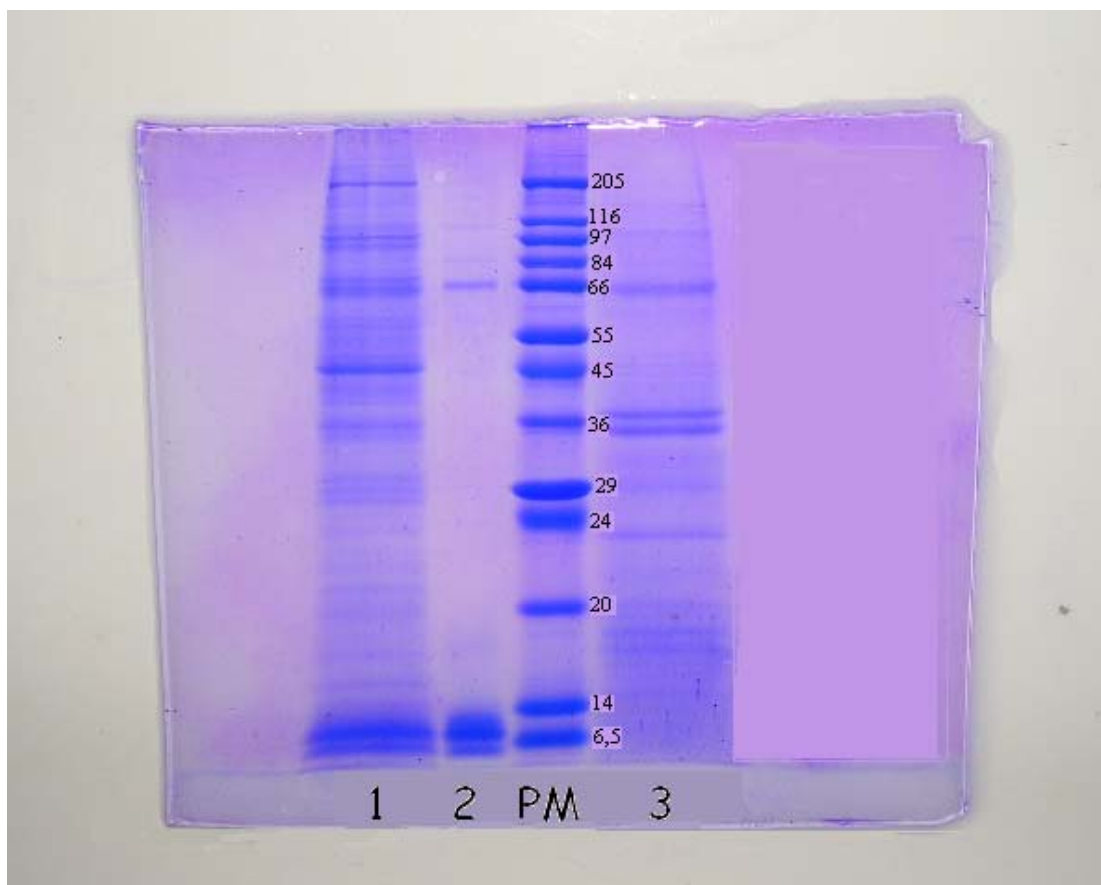


Figura 3. SDS-PAGE – 5 e 20%, corado pelo comassie blue dos antígenos Tera (1), Lvra (2) e Tsag (3) e Padrão de peso molecular - PM (205, 116, 97, 84, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20, 14 e 6,5 Kda).

4.3.2. Imunoblot

4.3.2.1. Técnica básica

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidos do gel para membranas de nitrocelulose de 0,2 μ (Millipore, USA) através da justaposição, segundo a metodologia descrita por TOWBIN et al (1979), utilizando solução tamponada de transferência contendo metanol (Tris-hidroximetilaminoetano 25mM; glicina 192mM e metanol 20% -

v/v-, pH 8,3). A transferência foi realizada durante um período de meia hora, a temperatura ambiente, voltagem constante de 100V, e outro período de duas horas com voltagem de 150V . Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas em solução aquosa contendo Ponceau-S a 0,5%, para visualização qualitativa e quantitativa da transferência.

A partir das membranas foram obtidas tiras de 3 a 4 mm de largura e, logo após, descoradas e lavadas três vezes em solução salina (NaCl 0,15M) contendo 0,05% (v/v) de tween-20, sendo armazenadas em papel filtro até o momento de sua utilização nas etapas seguintes do teste (Figura 4).

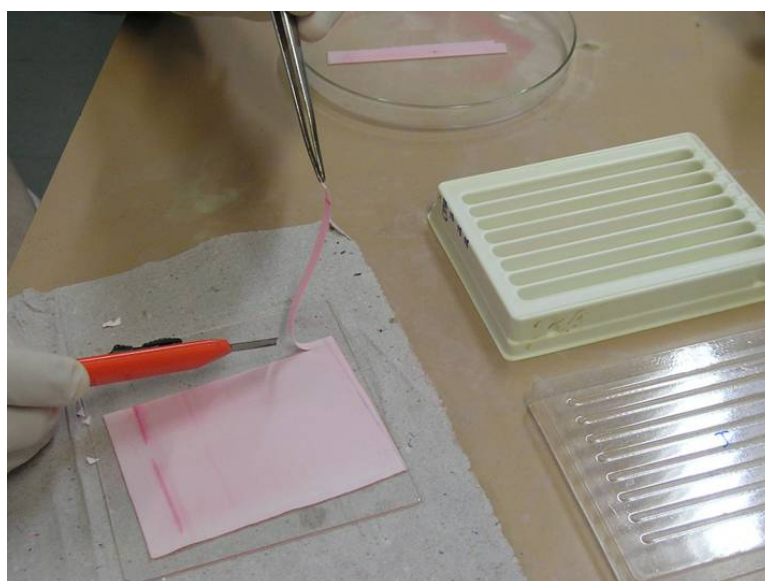


Figura 4. Obtenção das tiras de nitrocelulose após transferência, para utilização na fase de detecção imunológica no imunoblot

As tiras foram tratadas com solução bloqueadora [leite desnatado, Mólico – Nestlé], a 5% dissolvido em Tris-salina (Tris-hidroximetilaminoetano 10mM e NaCl 0,15M; pH 7,4), por aquecimento até cerca de 90°C e filtrado em papel de filtro] por uma

hora sob agitação lenta à temperatura ambiente. As amostras de soro adicionadas a solução diluidora (Solução bloqueadora diluída a 1:5 em Tris-salina) foram adicionadas às tiras e a incubação foi realizada por 14-18 horas, a 4°C, sob agitação lenta.

Após seis lavagens, cinco minutos cada, as tiras foram novamente incubadas por uma hora com os conjugados, anti-IgG de bovino A-7414 marcado com peroxidase, devidamente diluídos, e em seguida novas lavagens foram procedidas.

As proteínas reativas foram evidenciadas com a solução cromógena (Diaminobenzidina 5mg, H₂O₂ 1,5% em PBS pH 7,2) por cerca de 2 minutos, em seguida as tiras foram lavadas com água destilada e secas em papel filtro. Os referidos peptídeos foram analisados com o auxílio do programa Quantity One, versão 4⁴.

Na transferência, os testes preliminares foram priorizados com o antígeno Tcra, na concentração de 6µg/mm, devido sua maior disponibilidade, alta quantidade requerida e maior versatilidade de proteínas em relação aos demais (PINTO et al., 2001). Os demais testes contemplaram outros antígenos (LVcra, Tsag) e concentrações diferentes.

4.3.2.2. Padronização

Para cada bloco de testes foram utilizadas 3 cubas de detecção imunológica, uma para cada antígeno.

Com o propósito de testar basicamente variações de diluições ótimas de soro e de conjugado, foram analisadas as diluições 1/12,5, 1/25 e 1/50 de soro e, 1/1.000, 1/2000 e 1/5.000 de conjugado, empregando-se um soro-controle positivo e um negativo. Em seguida procedeu-se a confirmação do melhor bloco diante de três soros-controle negativos e três positivos. Outras combinações de diluições foram testadas de acordo com

⁴ Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA.

as tendências de melhor desempenho que apareceram no decorrer dos ensaios experimentais.

4.4. Avaliação do desempenho do imunoblot

4.4.1. Avaliação das proteínas reativos

As tiras de nitrocelulose foram dispostas lado a lado na cuba, em um total de 8 tiras, sendo divididas em pares, para a adição dos soros positivos experimentalmente (1 e 2), positivos naturalmente (3 e 4), negativos (5 e 6) e com outras patologias (7 e 8) como consta na figura 5.

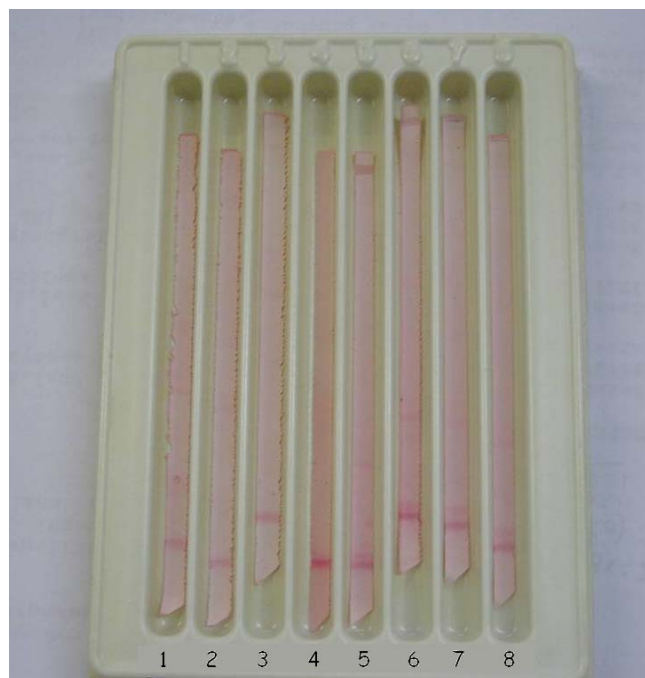


Figura 5. Disposição das tiras de nitrocelulose na cuba para fase de detecção imunológica no imunoblot. Soros positivos experimentalmente (1 e 2), positivos naturalmente (3 e 4), negativos (5 e 6) e com outras enfermidades (7 e 8).

Cada soro-controle foi submetido à reação do imunoblot nas condições estabelecidas nos itens 4.3.2.1. e diante dos blocos com melhor desempenho no item 4.3.2.2. Foi determinada a frequência média de reação dos diferentes proteínas dos antígenos capazes de reagirem com os anticorpos dos soros-controle dos diversos grupos de bovinos, conforme sua condição anátomo-patológica pré-determinada. A localização das proteínas reativas na tira de nitrocelulose, bem como sua aparência física, particularmente a intensidade de cor, foram consideradas na interpretação da reatividade e enumeração das mesmas (LARRALDE et al, 1989; TSANG et al., 1991).

4.4.2. Comparação dos diferentes tipos de antígenos

A comparação da reatividade dos antígenos total de *Taenia saginata* e vesicular e total de *Taenia crassiceps* no teste do imunoblot foi efetuada utilizando-se previamente um soro-controle positivo e um negativo, verificando a presença de algumas proteínas importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina, repetindo a titulação em bloco (item 4.3.2.2.) para os três diferentes antígenos. Após confirmar o melhor bloco, o teste foi conduzido com todos os soros-controle disponíveis (item 4.1.). Foram selecionadas as proteínas (bandas) que reagiram somente com os soros positivos, os quais foram provisoriamente identificadas como importantes, observando os critérios de localização (peso molecular), aparência recomendada por Larralde et al. (1989) e analisados pelo Programa Quantity One, versão 4.

4.4.3. Análise dos resultados

Em função dos resultados obtidos, foram determinados para cada proteína os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e concordância conforme anexo 1, visando estabelecer os critérios para diferenciação dos soros como positivos ou negativos para cisticercose bovina, ou seja, definição das proteínas importantes e estabelecimento dos critérios de positividade e de negatividade. Analisou-se ainda as diferenças de desempenho do imunoblot na detecção de soros positivos de animais naturalmente e experimentalmente infectados, além dos três tipos de antígenos utilizados no teste para o diagnóstico da cisticercose bovina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da infecção experimental e coleta de sangue, observou-se que todos os animais apresentaram, por meio do ELISA, níveis detectáveis de IgG após 45 dias de infecção (limite de detecção), resultados que concordam com Smith et al. (1990), Brandt et al. (1992) e Emre (1997), os quais encontraram níveis detectáveis de anticorpos entre 40 e 60 dias pós-infecção (Figura 6).

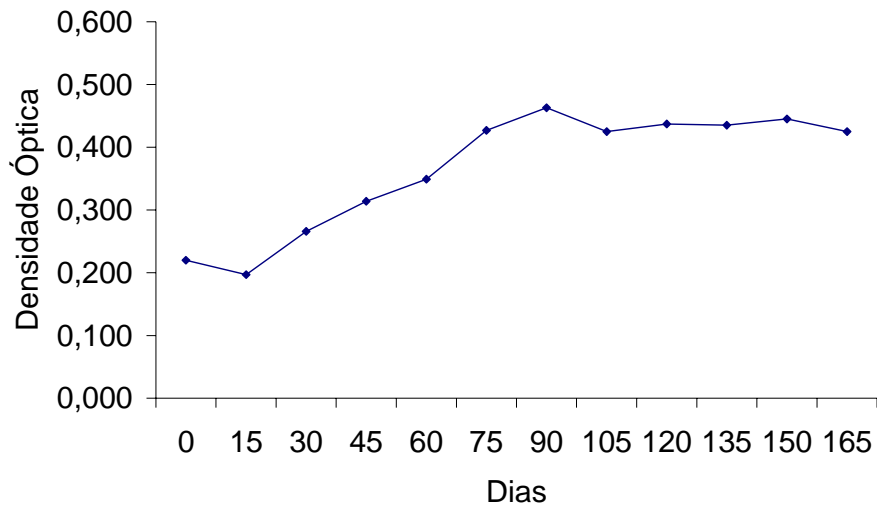


Figura 6. Nível de IgG (0-165 dias) em densidade óptica, por meio do teste de ELISA, dos animais infectados experimentalmente.

Visando a definição dos soros-controle experimentalmente positivos, para avaliar o desempenho do imunoblot no diagnóstico da cisticercose bovina, optou-se por utilizar amostras de soro a partir dos 45 dias de infecção experimental. Avaliando a evolução da infecção em níveis de anticorpos, não foi observado, nos soros testados, diferenças em relação à detecção das bandas, bem como na apresentação física das mesmas, nas diferentes fases de infecção. Entretanto, na fase de padronização do teste, observaram-se pequenas diferenças no aparecimento das bandas entre as diferentes fases de infecção, como mostra a figura 7.

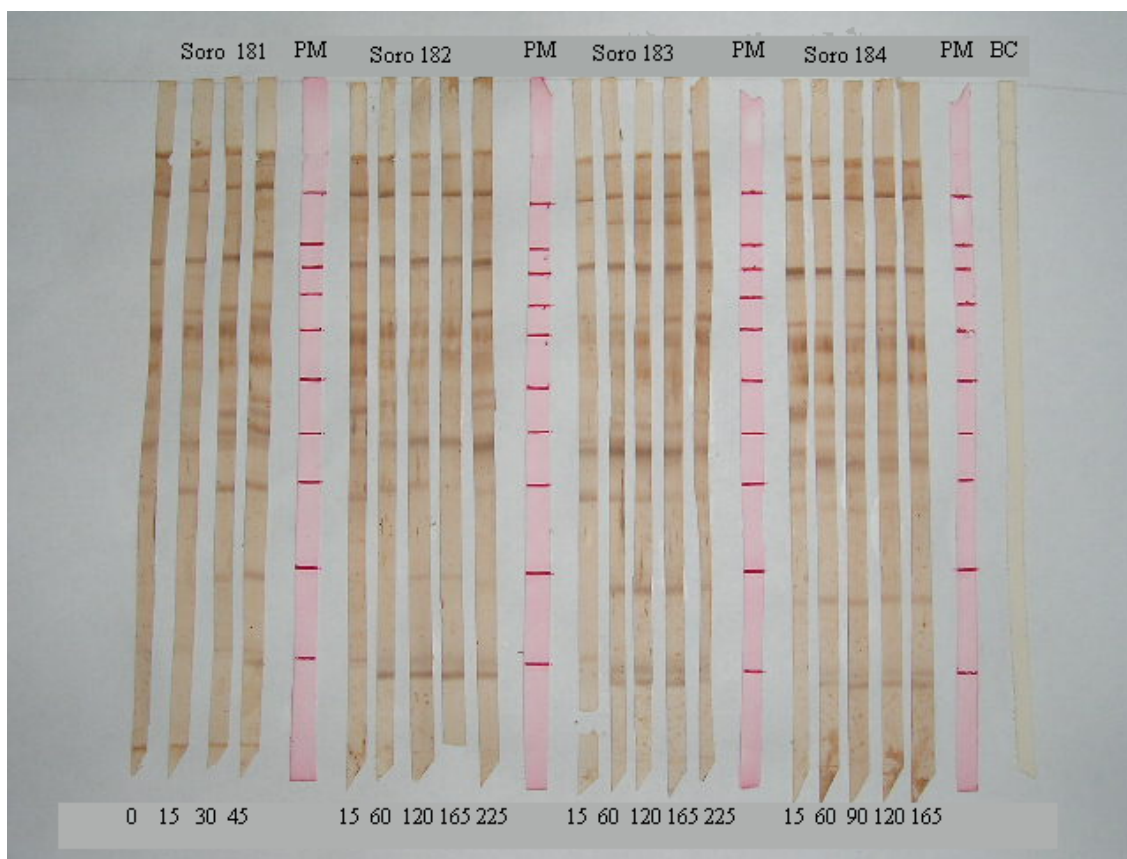


Figura 7. Detecção de anticorpos pelo imunoblot nas diferentes fases de infecção experimental (0-225 dias), nos soros 181, 182, 183 e 184, utilizando o padrão de peso molecular (PM-14, 20, 24, 29, 36, 55, 66, 84, 97, 205Kda) e o controle branco (BC).

Para definir a quantidade utilizada nos ensaios dos antígenos LVcra, Tcra e Tsag, foi realizada a dosagem protéica que resultou nos valores 3.100,00 μ g/ml, 11.000,00 μ g/ml e 8.500,00 μ g/ml respectivamente.

Na etapa de padronização do teste, na fase de eletroforese, a concentração de 5 a 20% em gel gradiente, apresentou melhores resultados relacionados à separação das bandas do que as outras concentrações testadas. Entre as diferentes quantidades de antígeno e padrão de peso molecular testados, optou-se por utilizar 30 μ g de cada antígeno

e 10µl de Padrão de peso molecular (PM) em cada corrida eletroforética. Ainda neste período, as titulações de soro e conjugado testadas que apresentaram resultados mais favoráveis à detecção e visualização das bandas nas tiras de nitrocelulose, na fase de detecção imunológica, foram 1:12,5 para todos os soros e 1:2000 de conjugado para os antígenos Tcra e LVcra e 1:1000 para o antígeno Tsag.

As tabelas 1, 2 e 3, apresentam no imunoblot com os antígenos LVcra, Tcra e Tsag, respectivamente, os resultados referentes à quantidade de proteínas detectadas nos soros dos animais experimentalmente e naturalmente infectados, negativos para cisticercose e que apresentavam outras enfermidades. Devido ao fato da interpretação dos resultados do imunoblot variar conforme a experiência do pesquisador como ressalta Larralde et al. (1989), a análise das proteínas neste experimento, foi realizada com o auxílio do programa Quantity One, visando diminuir essas variações.

Tabela 1. Frequência de proteínas reativas empregando o antígeno LVcra e soros controle de bovinos positivos experimentalmente e naturalmente, negativos e com outras infecções, no imunoblot.

Proteínas	Soros-controle			
	Positivos	Negativos		Outras Infecções
Peso (KDa)	Experimental	Natural		
183-191	3	2	0	0
171-177	5	3	2	2
163-169	3	4	1	2
152-155	8	7	4	3
130-147	4	4	3	0
101-115	6	10	8	3
92-98	4	3	1	0
87-89	3	4	1	0
72-77	2	2	0	0
62-67	19	22	19	14
57-61	10	12	10	4
51-56	13	11	8	4
41-47	10	10	11	4
34-35	0	2	0	0
22-24	10	2	3	3
18	18	1	1	0
14	21	4	1	0
8-11	3	2	0	0
4-6	16	6	1	0
Total	158	111	74	39

Tabela 2. Frequência de proteínas reativas empregando o antígeno Tcra e soros controle de bovinos positivos experimentalmente e naturalmente, negativos e com outras infecções, no imunoblot.

Proteínas	Soros-controle			
	Positivos		Negativos	Outras Infecções
Peso (KDa)	Experimental	Natural		
185-193	6	7	4	3
164-165	6	5	6	2
155	0	5	3	0
140-149	8	11	7	4
120-138	6	10	8	4
106-118	5	8	5	3
104-105	8	11	9	4
92-99	12	11	9	3
80-87	7	10	7	4
71-79	13	16	9	8
64-69	16	23	14	10
60-63	17	19	12	2
58-59	10	12	10	0
52-57	16	16	13	5
46-49	12	13	8	6
43-45	19	16	15	7
40-42	18	20	10	8
37-39	12	19	13	7
34-36	21	24	19	12
31-33	10	15	6	5
27-30	12	16	14	7
25-26	11	13	10	7
22-23	10	22	9	6
19-21	15	18	14	10
18	10	17	4	0
15-16	11	22	9	3
14	21	9	2	0
8-11	14	10	11	8
4-6	16	15	6	0
Total	342	413	266	138

Tabela 3. Freqüência de proteínas reativas empregando o antígeno Tsag e soros controle de bovinos positivos experimentalmente e naturalmente, negativos e com outras infecções, no imunoblot.

Proteínas	Soros-controle			
	Peso(KDa)	Positivos		Negativos
Experimental		Natural		
184-189	1	3	2	0
143-154	1	2	1	0
109-122	4	4	1	1
100-106	14	14	13	8
93-95	2	4	2	0
60-67	4	3	3	2
50-59	6	10	6	5
44-49	3	7	4	2
41-42	1	3	4	0
37-39	8	15	11	6
35-36	13	15	13	8
29-34	2	6	7	1
24-26	7	13	8	3
23	13	14	9	7
19-22	2	16	16	5
18	16	11	2	0
15-16	1	7	8	1
14	14	2	0	0
10-11	4	0	0	0
4-6	9	8	1	0
Total	125	157	111	49

Com base nos resultados obtidos, foram calculadas as taxas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e concordância para cada um dos antígenos e proteínas reativas, como consta nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4. Taxas de desempenho (%) das proteínas reativas no imunoblot empregando o antígeno LVcra.

Proteínas Peso(Kda)	Taxas de desempenho				
	S	E	VP+	VP-	C
183-191	12,5	100,0	100,0	53,3	56,3
171-177	20,8	89,7	71,4	53,7	56,3
163-169	12,5	92,3	75,0	52,3	54,2
152-155	33,3	82,1	66,7	55,6	58,3
130-147	16,7	92,3	57,1	51,2	52,1
101-115	25,0	71,8	42,9	47,1	45,8
92-98	16,7	97,4	80,0	53,5	56,3
87-89	12,5	97,4	75,0	52,3	54,2
72-77	8,3	100,0	100,0	52,2	54,2
62-67	79,2	15,4	50,0	50,0	50,0
57-61	41,7	64,1	50,0	50,0	50,0
51-56	54,2	69,2	61,9	59,3	60,4
41-47	41,7	61,5	47,6	48,1	47,9
34-35	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0
22-24	41,7	85,0	76,9	60,0	64,6
18	75,0	97,5	94,7	79,3	84,4
14	87,5	97,5	95,5	88,5	91,6
8-11	12,5	100,0	100,0	53,3	56,2
4-6	66,7	97,5	94,1	74,2	81,2

S: sensibilidade

E: especificidade

VP+: valor preditivo positivo

VP-: valor preditivo negativo

C: concordância

Tabela 5. Taxas de desempenho (%) das proteínas reativas no imunoblot empregando o antígeno Tcra.

Proteínas Peso(Kda)	Taxas de desempenho				
	S	E	VP+	VP-	C
185-193	25,0	82,1	60,0	52,6	54,2
164-165	25,0	79,5	50,0	50	50
155	0,0	92,3	0,0	46,7	43,8
140-149	33,3	71,8	53,3	51,5	52,1
120-138	25,0	69,2	42,9	47,1	45,8
106-118	20,8	79,5	50,0	50	50
104-105	33,3	66,7	47,1	48,4	47,9
92-99	50,0	69,2	57,1	55,6	56,3
80-87	29,2	71,8	50,0	50,1	50
71-79	54,2	56,4	59,1	57,7	58,3
64-69	66,7	38,5	53,3	55,6	54,2
60-63	70,8	64,1	58,6	63,2	60,4
58-59	41,7	74,4	50,0	50	50
52-57	66,7	53,8	55,2	57,9	56,3
46-49	50,0	64,1	60,0	57,1	58,3
43-45	79,2	43,6	55,9	64,3	58,3
40-42	75,0	53,8	64,3	70	66,7
37-39	50,0	48,7	48,0	47,8	47,9
34-36	87,5	20,5	52,5	62,5	54,2
31-33	41,7	71,8	62,5	56,3	58,3
27-30	50,0	46,2	46,2	45,5	45,8
25-26	45,8	56,4	52,4	51,9	52,1
22-23	41,7	61,5	52,6	51,7	52,1
19-21	62,5	38,5	51,7	52,6	52,1
18	41,7	89,7	71,4	58,8	62,5
15-16	45,8	69,2	55,0	53,6	54,2
14	87,5	94,9	91,3	88	89,6
8-11	58,3	51,3	56,0	56,5	56,2
4-6	66,7	84,6	72,7	69,2	70,8

S: sensibilidade

E: especificidade

VP+: valor preditivo positivo

VP-: valor preditivo negativo

C: concordância

Tabela 6. Taxas de desempenho (%) das proteínas reativas no imunoblot empregando o antígeno Tsag.

Proteínas Peso(Kda)	Taxas de desempenho				
	S	E	VP+	VP-	C
184-189	5,6	92,3	33,3	48,5	47,2
143-154	5,6	96,2	50,0	50	52,8
109-122	22,2	92,3	80,0	54,8	58,3
100-106	77,8	19,2	51,9	55,6	55,6
93-95	11,1	92,3	50,0	50	55,6
60-67	22,2	80,8	57,1	51,7	55,6
50-59	33,3	57,7	50,0	50	47,2
44-49	16,7	76,9	42,9	48,3	41,7
41-42	5,6	84,6	20,0	45,2	36,1
37-39	44,4	34,6	42,1	41,1	36,1
35-36	72,2	19,2	50,0	50	50
29-34	11,1	69,2	22,2	40,7	27,8
24-26	38,9	57,7	46,7	47,6	47,2
23	72,2	38,5	59,1	64,3	63,9
19-22	11,1	19,2	11,1	11,1	16,7
18	88,9	92,3	88,9	88,9	83,3
15-16	5,6	65,4	11,1	37	36,1
14	77,8	100,0	100,0	81,8	72,2
10-11	22,2	100,0	100,0	56,3	69,4
4-6	50,0	96,2	90,0	65,4	55,6

S: sensibilidade

E: especificidade

VP+: valor preditivo positivo

VP-: valor preditivo negativo

C: concordância

Melhores resultados de sensibilidade e especificidade foram apresentados pelas proteínas de baixo peso molecular. Também no imunoblot, Gonzalez et al. (1990), Tsang et al. (1991) e Pathak et al. (1994) utilizando soros suínos, encontraram valores de sensibilidade e especificidade entre 97 e 100%. Utilizando soros humanos, Gekeler et al. (2002), Macedo et al. (2002), Pinilla et al. (2003) e Oliveira et al. (2007), encontraram índices de sensibilidade e especificidade entre 79 e 99%.

Diferenças de sensibilidade e especificidade no imunoblot podem ocorrer devido a preparação antigênica, e também pelo tipo ou severidade das lesões encontradas e da reação inflamatória em torno do parasita (BUENO et al., 2000; GREENE et al., 2000).

Os valores alcançados neste experimento indicam que as proteínas com peso molecular de 4-6, 14 e 18KDa, podem ser consideradas importantes no diagnóstico da cisticercose bovina. Entretanto, deve-se ressaltar que os resultados aqui apresentados estão relacionados a apenas um protocolo de testes.

Nas condições experimentais deste trabalho, as proteínas de 4-6KDa apresentaram índices de 66,7, 66,7 e 50% de sensibilidade e 97,5, 84,6 e 96,2% de especificidade quando utilizados os antígenos LVcra, Tcra e Tsag, respectivamente. A proteína de 14KDa apresentou 87,5, 87,5 e 77,8% de sensibilidade e 97,5 94,9 e 100% de especificidade com os antígenos LVcra , Tcra e Tsag , respectivamente. A proteína 18KDa apresentou para LVcra, Tcra e Tsag, respectivamente, valores de 75, 41,7 e 88,9% de sensibilidade e 97,5, 89,7 e 92,3% de especificidade (Tabelas 3, 4 e 5).

Analisando as três proteínas citadas, observou-se que estas foram mais eficientes na diferenciação entre soros-controle positivos dos negativos no diagnóstico da cisticercose bovina, pois apresentaram taxas de concordância superiores, quase sempre acima de 60%, diferenciando-se assim das proteínas de médio e alto peso molecular.

Os resultados deste trabalho coincidem com os de outros pesquisadores, que reportaram a frequência de aparecimento e alta especificidade das proteínas de baixo peso molecular no imunoblot para o diagnóstico da cisticercose humana (ROSSI et al., 2000; PARDINI et al., 2002).

As comparações com outras pesquisas foram feitas a partir de resultados reportados em testes com amostras humanas e suínas, em virtude da escassez de trabalhos utilizando o imunoblot para pesquisa de anticorpos em bovinos.

Reforçando a importância de algumas proteínas no imunoblot, Macedo et al., (2002), observaram que os valores em densidade ótica encontrados no ELISA nos soros de pacientes com neurocisticercose eram significativamente mais altos no grupo que apresentava imunoblot positivo para as bandas de 13 e 14KDa. Dos 18 soros de pacientes que apresentavam neurocisticercose em fase transicional e positivos pelo imunoblot que estudaram, 11 reconheceram a banda de 14KDa no diagnóstico.

Também no imunoblot, Pardini et al. (2002) observaram que as proteínas de 14 e 18KDa foram reconhecidas apenas pelos soros de pacientes positivos para neurocisticercose.

Considerando os resultados dos testes feitos com o extrato total de cisticercos de *Taenia saginata* (Tsag), as proteínas mais frequentemente reconhecidas nos animais positivos para cisticercose foram, em ordem crescente: 4-6KDa, 14KDa e 18KDa. Outras proteínas de maior peso molecular também foram reconhecidas (23KDa, 24-26KDa, 35-36KDa, 37-39KDa e 100-106KDa), porém, presentes nas amostras de soros positivos, negativos, assim como nos soros dos bovinos com outras patologias, sendo deste modo, caracterizadas como proteínas de baixo valor diagnóstico.

Nos testes realizados com o extrato total de cisticercos de *Taenia crassiceps* (Tcra), as proteínas mais frequentes, reconhecidas nos animais com cisticercose, foram as mesmas do antígeno anterior. Porém, a detecção de anticorpos com o antígeno Tcra, nas amostras de soros dos animais naturalmente infectados foi superior aos resultados observados com o antígeno Tsag. O número de bandas reativas (22-23KDa, 25-26KDa, 34-36KDa, 43-45KDa, 60-63KDa e 92-93KDa) de baixo valor diagnóstico também foi superior; este antígeno apresentou ainda uma maior quantidade de proteínas disponíveis na preparação antigênica, para o imunoblot, quando comparado aos outros dois antígenos (Figura 8).

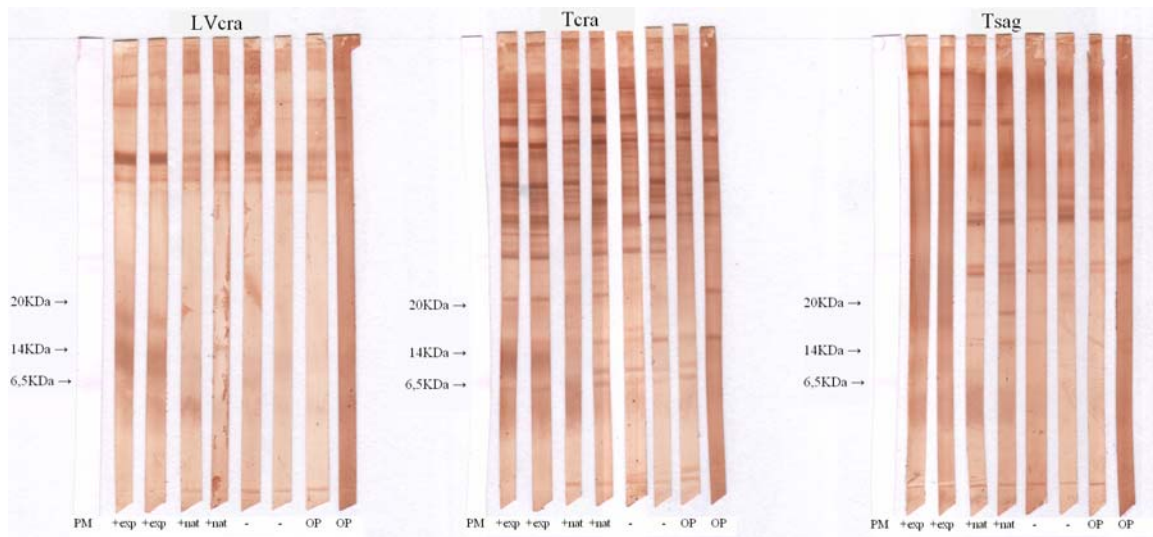


Figura 8. Quantidade e aspecto físico das proteínas detectadas pelos antígenos LVcra, Tera e Tsag nos soros de animais experimentalmente (+exp) e naturalmente infectados (+nat), negativos (-) para cisticercose e com outras patologias (OP) e Padrão de peso molecular (PM).

Nos testes realizados com o líquido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* (LVcra), nas amostras de soro dos animais positivos, repetiram-se os peptídeos mais freqüentes dos antígenos Tsag e Tera. Os peptídeos de baixo valor diagnóstico encontrados foram: 41-47KDa, 51-56KDa, 57-61KDa e 62-67KDa.

Em testes realizados por Pinto et al. (2001), por meio do imunoblot para o diagnóstico da cisticercose suína, as proteínas de baixo peso molecular de 14 e 18KDa, não foram detectadas pelo antígeno de *Taenia solium*, apenas pelo antígeno de *Taenia crassiceps*. Na fase de padronização deste experimento, na etapa de eletroforese, para que estas proteínas fossem reconhecidas com o antígeno de *Taenia saginata*, a concentração do referido antígeno foi dobrada (60µg), bem como a concentração de conjugado (1:1000)

Sugere-se desta forma, estudos adicionais que possam explorar o potencial diagnóstico destas proteínas nos testes imunológicos, variando a concentração de reagentes.

Todos os antígenos mostraram um número elevado de proteínas reconhecidas pelos soros. Entretanto, menor número de peptídeos foi apresentado pelo antígeno LVcra, coincidindo com a sua menor concentração protéica, conforme observado na dosagem de proteínas.

Na análise geral das proteínas, válida para os três antígenos testados, relacionada a características como intensidade de cor, área e altura, as bandas de 4-6, 14 e 18KDa destacaram-se entre as outras, mostrando um perfil diferenciado, com área e altura maiores, semelhantes a uma mancha. Observou-se ainda, que a mancha, correspondente a proteína de 14KDa, apresentou-se de duas formas. Quando a separação eletroforética das proteínas ocorreu por completo, a mancha dividiu-se em duas, sendo detectado no teste também a proteína de 4-6 KDa. Ao contrário, quando a separação eletroforética não ocorreu completamente, a mancha não se dividiu e apenas a proteína de 14KDa foi reconhecida. Este comportamento também foi verificado nos ensaios de padronização da eletroforese.

De outra forma, as proteínas de médio e alto peso molecular apresentaram-se sob forma de linha, perfil também observado por Pinto et al. (2001).

Comparando a intensidade de cor entre as proteínas de baixo, médio e alto peso molecular, as bandas mais destacadas e consideradas de baixo valor para o diagnóstico da cisticercose bovina foram: 62-67KDa para o LVcra, 22-23, 25-26, 35-36, 43-45, 60-63KDa para o Tcra e 23, 24-26, 35-36, 37-39 e 100-106KDa para o Tsag.

As outras proteínas detectadas no teste apresentaram-se como linhas finas, com pouca intensidade, ocorrendo de forma esporádica, sem determinar importância diagnóstica para doença, nas condições do experimento.

No presente estudo verificou-se, entre os resultados dos soros do grupo de animais considerados negativos para cisticercose bovina em estabelecimentos sob inspeção federal,

o aparecimento de bandas importantes para o diagnóstico da doença, o que pode ser atribuído a reações inespecíficas. Também, deve-se considerar a possibilidade de existirem animais falso-negativos nesse grupo, dada a baixa sensibilidade do exame anátomo-patológico. Entretanto, utilizando LVcra como antígeno, em uma amostragem de 74 (n=74) peptídeos reagentes com os soros negativos, apenas 1(1,3%) reagiu com as proteínas de 4-6, 14 e 18KDa (Tabela 1). Com o antígeno Tcra (n=266), os valores para as proteínas 4-6, 14 e 18KDa, foram de 6(2,2%), 2(0,75%) e 4(1,5%), respectivamente (Tabela 2). Com o antígeno Tsag (n=111), os valores foram 1(0,9%) para as proteínas de 4-6KDa, 0(0%) para a proteína de 14KDa e 2(1,8%) para a de 18KDa (Tabela 3).

Da mesma forma que animais considerados negativos para cisticercose podem apresentar sorologia positiva, mesmo utilizando os testes mais sensíveis, como o imunoblot, animais positivos podem apresentar sorologia negativa.

A ausência de anticorpos específicos para cisticercose em animais e pessoas com a doença, pode ocorrer em função de diferenças antigênicas entre os cisticercos, da evasão e da supressão da resposta imune por parte dos parasitas, do efeito imunossupressor do tratamento frequentemente administrados nos pacientes, além das diferenças da resposta imune do hospedeiro, que é dependente do número, localização e estágio evolutivo dos cisticercos (FLISSER, 1980; WHITE, 1997; SCIUTTO et al, 2000).

Reações cruzadas com extratos preparados a partir de cisticercos de *Taenia crassiceps* com soros humanos e suínos com outras infecções, principalmente hidatidose têm sido descritas (ROSSI, 2000; PINTO et al, 2001). Verastegui et al. (1992), analisaram soros humanos com hidatidose e cisticercose pelo imunoblot e observaram reação cruzada entre as proteínas de 8, 16 e 21KDa. No presente estudo, as proteínas citadas não apresentaram reatividade com os soros dos animais com hidatidose. Deve-se ressaltar que no presente experimento, a amostragem de soros com outras patologias foi pequena, em

virtude da dificuldade em se adquirir estes soros. Não foram observadas reações cruzadas com outras doenças entre as três preparações antigênicas e as proteínas de 4-6, 14 e 18KDa. Entretanto, grandes índices de reatividade foram observados com as proteínas entre 62-67KDa, quando utilizado o antígeno LVcra, 19-21, 34-36 e 64-69KDa quando utilizado o antígeno Tcra e 23, 35-36 e 100-106 quando utilizado o antígeno Tsag, frente aos soros de bovinos com outras patologias.

Vários estudos têm mostrado que os testes imunológicos para neurocisticercose apresentam menor probabilidade de reatividade em pacientes com cistos calcificados do que em pacientes apresentando parasitas em outros estágios evolutivos (ESPINOZA et al., 1986; WHITE, 1997; SCIUTTO et al., 2000). Michaulat et al. (1990) citado por Macedo et al. (2002), utilizando como antígeno cisticercos de *Taenia solium*, observaram que todas as amostras de pacientes com neurocisticercose ativa reconheceram a banda de 14Kda, não aparecendo nas outras doenças parasitárias nem no soro de pacientes com a forma inativa da doença ou com calcificação em processo. Das quatro amostras de soro de animais com cistos calcificados testadas neste estudo, duas reagiram com a banda de 18KDa, concordando com os resultados de Michaulat et al. (1990). No entanto, uma das amostras reagiu com as bandas de 18 e 14KDa simultaneamente. Desta forma, suspeita-se de que este animal, com reação simultânea era portador de cistos calcificados e vivos.

Comparando os resultados apresentados entre os soros de animais naturalmente e experimentalmente infectados observou-se que o teste foi mais eficiente, com o protocolo utilizado, nos soros de infecção experimental. Utilizando o LVcra como antígeno, em um total de 158 proteínas reativas (n=158), nas amostras de soro de animais experimentalmente infectados, 16(10,1%) reagiram com a proteína de 4-6 KDa, 21(13,3%) com a de 14KDa e 18(11,4%) com a de 18KDa. Nas amostras de soro de animais naturalmente infectados, com n=111, esses valores, para as mesmas proteínas

foram 6(5,4%), 4(3,6%) e 1(0,9%) respectivamente (Tabela 1). Utilizando o antígeno Tcra, em soros positivos experimentalmente, com n=342, 16(4,7%) reagiu com a proteína de 4-6KDa, 21(6,1%) com a de 14 KDa e 10(2,9%) com a de 18KDa. Com os soros de animais naturalmente infectados, com n=413, 15(3,6%) reagiu com a proteína de 4-6KDa, 9(2,2%) com a de 14KDa e 17(4,1%) com a de 18KDa (Tabela 2). Utilizando Tsag como antígeno os valores foram, com os soros de animais experimentalmente infectados, com n=125, 9(7,2%), 14(11,2%) e 16(12,8%) para as proteínas de 4-6, 14 e 18KDa respectivamente, e com os soros de animais naturalmente infectados, com n=157, 8(5,1%), 2(1,8%) e 11(7,0%) para as proteínas de 4-6, 14 e 18KDa respectivamente (Tabela 3). Desta forma, novos testes com outros protocolos devem ser realizados com a finalidade de aumentar a eficiência do imunoblot para na detecção de bovinos naturalmente infectados.

Considerando as sugestões de Pinto et al. (2001), quanto ao critério de interpretação dos resultados do imunoblot como positivos para cisticercose, quando houver o aparecimento simultâneo de duas ou mais proteínas importantes para o diagnóstico, podem ser extraídas duas discussões a partir dos resultados dessa pesquisa (Tabela 7).

Tabela 7. Taxas de desempenho das proteínas importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina

Proteínas (KDa)	Lvcra					Antígenos Tcra					Tsag				
						Taxas									
	S	E	VP+	VP-	C	S	E	VP+	VP-	C	S	E	VP+	VP-	C
18	75,5	97,5	94,7	79,3	84,4	41,7	89,7	71,4	58,8	62,5	88,9	92,3	88,9	88,9	83,3
14	87,5	97,5	95,5	88,5	91,6	87,5	94,9	91,3	88	89,6	77,8	100	100	81,8	72,2
4-6	66,7	97,5	94,1	74,2	81,2	66,7	84,6	72,7	69,2	70,8	50	96,2	90	65,4	55,6
18X14	20,8	100	100	55,8	60,4	25	100	100	57,1	62,5	44,4	100	100	64,3	72,2
18X14X4-6	50	100	100	66,6	75	37,5	100	100	61,5	68,7	44,4	100	100	64,3	72,2

Considerando duas proteínas como critério de interpretação de positividade, em geral, houve redução das taxas de sensibilidade e elevação das taxas de valor preditivo positivo e de especificidade, pois, constatou-se que nenhum dos soros de animais negativos para doença reagiu com mais de uma das proteínas importantes. Este critério pode ser importante em situações de confirmação de diagnóstico ou levantamento da prevalência da cisticercose bovina, onde ocorram outras doenças que também respondam imunologicamente ao teste com reações cruzadas. Por outro lado o critério de se interpretar a positividade com apenas uma proteína reativa parece ser mais recomendável em situações de levantamento da cisticercose bovina, onde a doença não é conhecida, dada a elevação da sensibilidade do teste.

Variações nas performances de reações imunológicas para o diagnóstico da cisticercose são esperadas e provavelmente estão relacionadas a vários fatores, incluindo a variação da resposta imunológica e heterogeneidade de cada animal, o tempo decorrido entre o início da infecção e a coleta das amostras de sangue, o número, a localização e o estágio evolutivo dos cisticercos, além das propriedades intrínsecas das técnicas utilizadas para detecção de anticorpos e os métodos utilizados para expressão dos resultados. A eficiência do imunoblot pode também variar de acordo com o lote do antígeno, a separação eletroforética e a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (TSANG et al., 1989). Além disso, o tipo e a quantidade de antígeno utilizado também contribuem para um melhor ou pior desempenho do teste.

Levando em consideração o risco para saúde pública e os prejuízos econômicos tanto para os matadouros quanto para os pecuaristas, medidas de controle sanitário e de inspeção devem ser tomadas não só no momento do abate, mas ainda na fase de produção. Neste sentido, o desenvolvimento de um método diagnóstico confiável como o imunoblot

poderia servir como alternativa ou aperfeiçoamento da inspeção nos matadouros, em investigações epidemiológicas ou na rastreabilidade dos focos de cisticercose.

É neste contexto, que os ensaios imunoenzimáticos, bem como os antígenos heterólogos, podem constituir uma importante ferramenta para o diagnóstico da cisticercose. Com base nos resultados obtidos neste experimento, principalmente relacionados as proteínas de baixo peso molecular, e a grande quantidade de proteínas de baixo valor diagnóstico encontradas, pesquisas com variações no protocolo devem ser realizadas visando avaliar melhor o desempenho diagnóstico destas proteínas, bem como o potencial dos antígenos utilizados. Novas pesquisas devem ainda, tornar a identificação da cisticercose bovina cada vez mais segura, com margem de erro mínimo e proporcionar a implantação de medidas de controle eficazes.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Diante dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e concordância obtidos para cada antígeno testado, concluiu-se que os antígenos de cisticercos de *Taenia crassiceps*, além de serem antígenos de fácil produção e manutenção em laboratório, apresentam bandas reativas importantes, comportando-se favoravelmente ao seu emprego no diagnóstico da cisticercose bovina, assim como o de *Taenia saginata*.

Após a análise do comportamento do Imunoblot verificou-se que as bandas de 4-6, 14 e 18KDa podem ser utilizadas como um meio de diagnóstico da cisticercose bovina, pois são capazes de diferenciar soros de animais positivos dos negativos e não apresentaram reação cruzada com soros de animais com outras patologias. Porém, diante dos resultados obtidos com o presente estudo, pode-se concluir que o imunoblot apresenta deficiências no diagnóstico imunológico de animais destinados ao abate, em virtude de sua baixa sensibilidade quando se considera soros de animais com infecção natural, geralmente discreta e mais freqüente em matadouros.

Desta forma, com base nos resultados obtidos neste experimento, principalmente relacionados as proteínas de baixo peso molecular, e a grande quantidade de proteínas de baixo valor diagnóstico encontrados, pesquisas com variações no protocolo devem ser realizadas visando avaliar melhor o desempenho diagnóstico destas proteínas, bem como o potencial dos antígenos utilizados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUSSALAM, M. **El problema de la teniasis-cisticercosis**. In: Reunion Interamericana sobre el control de la Fiebre Aftosa y otras Zoonosis, 7., Puerto España, 1974. Organización Panamericana de la Salud, 1975. p. 117-129. (OPAS - Publicación Científica, 295).

ACHA, P., SZIFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2 ed. Washington : OPS/OMS, 1986. 989p.

ALMEIDA, L.P.; MOREIRA, N.D.; REIS, D.O.; SANTOS, W.L.M. Cisticercose bovina: um estudo comparativo entre os animais abatidos em frigoríficos com serviço de inspeção federal e com inspeção municipal. **Rev. Hig. Alim.**, v. 16, n. 99, p. 51-55, 2002.

ALUJA A., ESCOBAR A., ESCOBEDO F., FLISSER A., LACLETTE J., LARRALDE C., MADRAZO C., VELÁZQUEZ K. **Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium***. México, D.F.: Biblioteca de la Salud, Fondo de Cultura Económica, 1987.

ANUALPEC – **Anuário da Pecuária Brasileira**. FNP Consultoria & Comércio, Editora Argos, São Paulo SP, p.62, 2006.

ARRUDA, G. C., SILVA, A. D. T., QUAGLIATO, E. M. A. B., MARETTI, M. A., ROSSI, C. L. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Trop. Med. Int. H.**, v. 10, n. 10, p.1005-1012, 2005.

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.

BRAGAZZA, L.M., VAZ, A.J., PASSOS, A.D., TAKAYWANAGUI, O.M., NAKAMURA, P. M., ESPÍNDOLA, N.M., PARDINI, A., BUENO, E.C. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural Brazilian community (Cássia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.44, no.1, p. 7-12, 2002.

BRANDT, J.R.A., GEERTS, S., DE DEKEN R., KUMAR, V., CEULEMANS, F., BRIJS, 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, n.4, p.471-477, 1992.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Aprovado pelo Decreto 30.691 de 29-03-52, alterado pelos Decretos 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, 1.812 de 08-02-96 e 2.244 de 04-06-97. Brasília, 1997. 174p.

BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; MIELLE, S.R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Antigenic Peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 146-151, 2000.

CALIL, R. M. Situação atual do complexo teníase humana-cisticercose no Brasil. **Comun. cient. Fac. Med. vet. Zoot. Univ. S. Paulo**, v.8, n.2, p.227-229, 1984.

CÔRTEZ, J.A. Complexo Teníase Humana-Cisticercose Bovina e Suína II-Cisticercose Bovina e Suína. **Rev. Educ. Cont.**, v.3, n. 2, p. 61-71, 2000.

COSTA-CRUZ, J.M., ROCHA, A., SILVA, A.M., MORAES, A.T., GUIMARÃES, A.H.B., SALOMÃO, E.C., ALCÂNTARA, T.M. Ocorrência de cisticercose em necropsias realizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v.53, n.2, p. 227-232, 1995.

DEL BRUTTO, O.H., SOTELO, J. Neurocysticercosis: an update. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1075-87, 1988.

DIAZ, J.F., VERASTEGUI, M., GILMAN, R.H., TSANG, V., PITCHER, J.B., GALLO, C., GARCIA H.H., TORRES, P., MONTENEGRO, T., MIRANDA, E. The Cysticercosis Working Group in Peru. Immunodiagnosis of cysticercosis: A field comparison of an antibody ELISA, an antigen-ELISA, and an EITB assay in Peru. **Am J. Trop. Med. Hyg.** v. 46, p.10-5, 1992.

EMRE, Z. Studies on serodiagnosis of bovine cysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **T. Vet. Hayv. Derg.**, v.21, n.6, p.471-476, 1997.

ESPINOZA, B., RUIZ-PALACIOS, C., TOVAR, A., SANDOVAL, M. A., PLANCARTE, A., FLISSER, A. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 24, p. 536-541, 1986.

FLISSER, A., WOODHOUSE E, LARRALDE C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 39, p. 27-37, 1980.

FOSTER, W.D. **The Cestodes.** In: FOSTER, W.D. **A History of parasitology.** Edinburg: E & Sm Livingstone, p. 29-51, 1965.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (FUNASA). **Guia de vigilância epidemiológica. Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos Específicos c. 5.33. Teníase/Cisticercose.** Disponível em www.fus.gov.br/conepi/GVE/GVE0533B.htm. Acessado em 27 de fevereiro de 2007, 11 horas.

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.

GALLIE, G.J., SEWELL, M.M.H. Inoculation of calves and adult cattle with oncospheres of *Taenia saginata* and their resistance to challenge infection. **Trop. An. H. Prod.**, v.13, p.147-154, 1981.

GEKELER, F., EICHENLAUB, S., MENDOZA, E., SOTELO, J., HOELSCHER, M., LÖSCHER, T. Sensitivity and Specificity of ELISA and Immunoblot for Diagnosing Neurocysticercosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.**, v. 21, n. 3, 2002.

GEMMELL, M.A. A critical approach to the concepts of control and eradication of echinococcosis/hydatidosis and teniasis/cysticercosis. **Int. J. Parasitol.**, v.17, n.2, p.465-472, 1987.

GEMMELL, M., MATYAS, Z., PALOWSK, Z., SOULZBY, E.J.L., LARRALDE, C., NELSON, G.S., ROSICKY, B. **Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of Taeniasis/Cysticercosis**, VPH/83.49, WHO, p. 207, 1983.

GONZÁLEZ, A., CAMA, V., GILMAN, R. Prevalence and comparison of serologic assays necropsy and tongue examination for the diagnosis for porcine cysticercosis in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, p.194-199, 1990.

GOTTSTEIN, B., TSANG, V. C. W., SCHANTZ, P. M. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *T. solium* metacestode antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.35, p. 308 -313, 1986.

GOTTSTEIN, B., ZINI, D., SCHANTZ, P. M. Species-specific immunodiagnosis of *T. solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. **Trop. Med. Parasitol.**, v.38, p. 299-303, 1987.

GRACEY, J.F. ,COLINS, D.S. **Meat Higyene**. Bailliere Tindall, 8.ed.London, p. 393-401, 1986.

GREENE, R.M., HANCOCK, K., WILKINS, P. P, TSANG, V.C.W. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. **J. Parasitol.** v. 86, p. 1001–1007, 2000.

GUSSO, R.L.F. ,CAMARGO, N.J., SILVA, L.R. Controle da teníase e cisticercose no estado do Paraná. **Rev. Hig. Alim.**, v. 9, p. 14-14, 1999.

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, 1981.

HAYUNG, E.G., SUMNER M.P., RHOADS M.L., MURRELL K.D., ISENSTEIN R.S. Development of a serologic assay for cysticercosis, using na antigen isolated from *Taenia spp* cyst fluid. **Am. J. Vet. Res.**, v. 52, p. 462-70, 1991.

HITO, A., E HASHIMOTO, A. Vaccination with hatched but non- viable oncospheres of *Taenia taeniformes* in rats, **J. Helminthol.**, n.67, p.165-168, 1983.

ILSOE, B., KYVSGAARD, N., NANSEN, P., HENRIKSEN, S.A. A study on the survival of *Taenia saginata* eggs on soil in Denmark. **Acta. Vet. Scand.**, v.31, p.153-158, 1990.

ITO, A., PLANOARTE, A., NAKAO, M., NAKAYA, K., IKEJIMA, T., PIAO, Z.X., KANAZAWA, T. AND MARGONO, S.S. ELISA and immunoblot using purified glycoprotein in pigs naturally infected with *Taenia solium*. **J. Helminthol.**, v.73, p. 363-365, 1999.

KAMANGA-SOLLO, E.I., RHOADS M.L., MURRELL K.D. Evaluation of an antigenic fraction of *Taenia hidatigena* metacestode cyst fluid for immunodiagnosis. **Am. J. Vet. Res.**, v.48, p.1206-1210, 1987.

KUMAR, D., E GAUR, S.N.S. Serodiagnosis of porcine cysticercosis by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using fractionated antigens. **Vet. Parasitol.**, v. 24, p.195-202, 1987.

KYVSGAARD, N.C., ILSOE, B., WILLEBERG P., NANSEN, P., HENRIKSEN, S.A. Evaluation of an 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. **Nat.** v.227,p.680-685, 1970.

LARRALDE, C. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.40, n.3, p.282-290, 1989.

MACEDO, H.W., PERALTA, R.H.S., CIPRIANO, A., SARMENTO, M.R., VAZ, A.J., PERALTA, J.M. Evaluation of immunological tests for the diagnosis of neurocysticercosis. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n. 2, p. 93-103, 2002.

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.

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*. **C. Rur.**, v.34, n.3, p.857-864, 2004.

MIRANDA, Z. B. Inspeção de produtos de origem animal. **Rev. CFMV**, n.26, p. 21-26, 2002.

MONTEIRO, L.L., PINTO, P.S.A., DIAS, F.S. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. **Vet. Parasitol.** v.,141, n.3-4, p.260-263, 2006. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.017>.

MONTENEGRO, T., GILMAN, R.H., CASTILLO, R. TSANG, V., BRANT, J., GUEVARA, A., SANABRIA, H., VERASTEGUI, M., STERLING, C., MIRANDA, E. The diagnostic importance of species specific and Cross reactive components of *Taenia solium*, *Equinococcus granulosus*, and *Hymenolepis nana*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 36, p. 327-334, 1994.

MOREIRA, M.D., ALMEIDA, L.P., REIS, D.O., SANTOS, WAGNER L. M. Cisticercose bovina: um estudo com bovinos abatidos em matadouro municipal de Uberlândia, MG. **Rev. Hig. Alim**, v.16, p. 37-41, 2002.

NASCIMENTO, E. Teníase e Cisticercose. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 8. ed. São Paulo. Editora Atheneu, p. 230-242, 1991.

NETO, F.I., PIANETTI-FILHO, G., ARAUJO, R.N., NASCIMENTO, E. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by using semi-purified scolex antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 2, p. 163-169, 2007.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. In : SILVA, A. V. M. Teníase e cisticercose. 11 ed. São Paulo: Atheneu, p. 227-237, 2005.

NCBI. **Descrição taxonômica de *Taenia solium* y *Taenia saginata***. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>. Acessado em 23 de fevereiro de 2007, 13 horas.

OLIVEIRA, H.B., MACHADO, G.A., CABRAL, D.D., COSTA-CRUZ, J.M. Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. **Parasitol. Res.**, v. 1007, p. 101-104, 2007.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS) **Diagnóstico de la salud animal en las Américas**. Washington, DC, p. 101-3, 1983. (Publicación científica, 452).

PAIVA, D. P. **Conhecendo a prevalência da Cisticercose Suína e Bovina no Brasil**. Disponível em: http://www.suinculturaindustrial.com.br/sitedinamica.asp?tipo_tabela=cet&id=15934&categoria=saude_animal>. Acessado em 23 de fevereiro de 2007, 14 horas.

PARDINI, A.X., PERALTA, R.H.S., VAZ, A.J., MACHADO, L.R., PERALTA, J.M. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detect of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 190-193, 2002.

PATHAK, K.M.L., ALLAN, J.C.; ERSFELD, K., CRAIG, P.S. A Western blot and ELISA assay for the diagnosis of *Taenia solium* infection in pigs. **Vet. Parasitol.**, v. 53, p. 209-217, 1994.

PATHAK, K. M. L. Cysticercosis in Índia. A review and uptdate of cysticercosis caused by *Taenia solium*. **Zoon. Rev. Int.**, v. 1, n. 2, p. 21-29, 1989.

PAWLOWSKI, Z.S. **Teniasis and cysticercosis**. In: JACOBS, L., ARAMBULO, P. CRC handbook series in zoonoses: parasitic zoonoses. Boca Raton, CRC Press, v.1, p.313-348, 1982.

PESSÔA, S.B., MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 872, 1982.

PIALARISSI, C.S.M., VAZ, A.J., SOUZA, A.M.C., NAKAMURA, P.M., CAMARGO, E.D., SILVA, M.V., UEDA, M. Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v. 29 p.367 -373,1987.

PINTO, P.S.A., VAZ, A.J., NAKAMURA, P.M., GERMANO, P.M.L. Immunoblot analysis using antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci in the diagnosis of swine cysticercosis. **Bol. Chil. Parasitol.**, v.56, n.1-2, p.36-42, 2001.

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.11, n.77, p.12-15, 2000.

REY, L. **Parasitologia** - parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, p.731, 2001.

RODRIGUES, L.V.C. Inspeção sanitária e critério de julgamento da cisticercose bovina calcificada. Infecção leve. **C. Rur.**, v.23, n.3, p.339-344, 1993

RODRIGUEZ-CANUL, R., ALLAN, J.C., FLETES, C., SUTSNA, I.P., KAPTI, I.N., CRAIG PS. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoprotein and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 4, p. 579-582, 1997.

ROSSI, N., RIVAS, I., HERNÁNDEZ, B. M., URDANETA, R. H.. Inmunodiagnóstico de La neurocisticercosis: Estudio comparativo de extractos antigénicos de *Cysticercus cellulosae* y *Taenia crassiceps*. **Rev. Cub. Med. Trop.**, v. 52, p. 157-164, 2000.

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. Diagnóstico da cisticercose bovina em matadouros. **Rev. Hig. Alim.**, v.7, n.25, p.26-24, 1993.

SANTOS, I. F. Nova técnica de exame do coração na rotina de inspeção da cisticercose bovina. **Rev. Hig. Alim**, v.1, n. 2, 1982.

SATO, M.O., YAMASAKI, H., SAKO, Y., NAKAO, M., NAKAYA, K., PLANCARTE, A., KASSUKU, A.A., DORNY, P., GEERTS, S., BENITEZ-ORTIZ, W., HASHIGUCHI, Y., ITO, A. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. **Vet. Parasitol.**, v.111, p.309-322, 2003.

SCHEN, F.B., SANTOS, M.D., MONTEIRO NETO, G.J., CALDART, D., MACEDO, M., FONSECA, C.R. C. Prevalência de cisticercose em bovinos abatidos em frigoríficos com Inspeção Federal no estado do Mato Grosso. In: XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), Gramado. RS. **Anais**. Porto Alegre: SOVERGS, p.57, 2002.

SCHANTZ, P., SARTI, E., PLANCARTE, A., WILSON, M., CRIALES, J., ROBERTS, J. Community based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*. Comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. **Clin. Infect. Dis.**, v.18, p.879-885, 1994.

SCIUTTO, E., FRAGOSO, G., FLEURY, A., LACLETTE, J. P., SOTELO, J., ALUJA, A., VARGAS, L., LARRALDE, C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. **Microbes. Infect.**, v. 2, p. 1875-90, 2000.

SHIGUEKAWA, K.Y.M., MINEO, J.R., MOURA, L.P., COSTA-CRUZ, J.M. Elisa and western blotting tests in the detection of igg antibodies to *taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. **Trop. Med. Int. H.**, v. 5, n. 6, p 443-449, 2000.

SIMAC, C., MICHEL, P., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., ESTERRE, P., MICHAULT, A. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis. **Parasitol. Res.**,v. 81, p. 132-136, 1995.

SMITH, H.J., SNOWDON, K. E., FINLAYET, R. C. Serological diagnosis of cysticercosis by an enzyme-linked immunosorbent assay in experimentally infected cattle. **Can. J. Vet. Res.**, v.55, n.3, p.274-276, 1991.

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.

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.

SPINA-FRANÇA, A. **Neurocisticercose**. In: MARCONDES, M.; SUSTOVICH, D. R.;RAMOS, O.L. eds. Propedêutica e Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 718-724, 1976.

SUZUKI, L.A., ARRUDA, G.C., QUAGLIATO, E.M.A.B., ROSSI, Q.L. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 152-155, 2007.

TERRAZAS, L.I., BOJALIL, R., GOVEZENSKY, T., LARRALDE, C. A role for 17-beta estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia solium*). **J Parasitol** , v. 80, p. 563-568, 1994.

TOLEDO, A., LARRALDE, C., FRAGOSO, G., GEVORKIAN, G., MANOUTCHARIAN, K., HERNÁNDEZ, M., ACERO, G., ROSAS, G., LÓPEZ-CASILLAS, F., GARFIAS, C.K., VÁZQUEZ, R., TRRAZAS, I., SCIUTTO, E. Towards a *T. solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *T. crassiceps* and *T. solium* protects mice against experimental cysticercosis. **Infect. Immunity.**, v. 67, p. 2522-2530, 1999.

TORRES, F. O., ROCCO, F.S., MIRANDA, Z.B. Prevalência da cisticercose bovina no estado do Rio de Janeiro em estabelecimentos sob Inspeção Federal. In: XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), 2002, Gramado. RS. **Anais.** Porto Alegre: SOVERGS, p.57, 2002.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, I. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.76, p.4350-4352, 1979.

TSANG, V.C.W., PILCHER, J.A., ZHOU, W., BOYER, A.E., KAMANGO-SOLLO, E.I.P., RHOADS, M.L., MURRELL, K.D., SHANTZ, P.M., GILMAN, R.H.. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.29, p.69-78, 1991.

TSANG, V.C.W., BRAND, A., BOYER, A.E. An enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay by glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **J. Infect. Dis.**, v.159, p. 50-59, 1989.

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. Prevalência da cisticercose bovina no estado de São Paulo (Brasil). **Rev. Saúde públ.**, v.26, n.3, p.167-172, 1992.

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

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

VAZ, A.J. NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.F. VAZ, A.J., NUNES, C.M., PIAZZA, R.M.F., LIVRAMENTO, J.A., NAKAMURA, P.M., FERREIRA, A.W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *T. solium* and *T. crassiceps*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.57, p.354-357, 1997.

VERASTEGUI, M., GONZALEZ, A., GILMAN, R.H., GAVIDIA C., FALCON N., BERNAL T., GARCIA H.H. Experimental infection model for *Taenia solium* cysticercosis in swine. **Vet. Parasitol.**, v.94, p.33-44, 2000.

YANG, H.J., CHUNG, J.Y., YUN, D.H., KONG, Y., ITO, A., MA, L., LIU, Y.H., LEE, S.C., KANG, S.Y., CHO, S.Y. Immunoblot analysis of a 10kD antigen in cyst fluid of *T. solium* metacestodes. **Parasite Immunol.**, v. 20, p. 483-488, 1998.

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

WHITE, A.C. Neurocysticercosis: Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. **An. Rev. Med.**, v.51, p.187-206, 2000.

WHITE, A.C. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. **Clin. Infect Dis.**, v. 24, p. 101-15, 1997.

ANEXO 1

O cálculo das taxas de desempenho do imunoblot foi realizado através da tabela e fórmulas a seguir:

		Doença (cisticercose)		Total
		Presente	Ausente	
Teste (imunoblot)	Positivo	a verdadeiro positivo	b falso positivo	a+b
	Negativo	c falso negativo	d verdadeiro negativo	c+d
Total		a+c	b+d	a+b+c+d

Sensibilidade (S): é a probabilidade de um teste dar positivo na presença da doença, isto é, avalia a capacidade do teste detectar a doença quando ela está presente.

$$S = a / (a+c) \times 100$$

Especificidade (E): é probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença, isto é, avalia a capacidade do teste afastar a doença quando ela está ausente.

$$E = d / (b+d) \times 100$$

Valor preditivo positivo (VP+): é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo. Expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença.

$$VP+ = a / (a+b) \times 100$$

Valor preditivo negativo (VP-): é a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo. Expressa a probabilidade de um paciente com o teste negativo não ter a doença.

$$VP- = d / (c+d) \times 100$$

Concordância (C): leva-se em consideração o número de amostras verdadeiro positivas (a), o número de amostras verdadeiro negativas (d) e o total de amostras examinadas (a+b+c+d). É a concordância entre os valores de sensibilidade e especificidade do teste.

$$C = a+d / (a+b+c+d) \times 100$$