

RAFAELLA PAOLA MENEGUETE DOS GUIMARÃES PEIXOTO

**NOVOS PEPTÍDEOS E ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Taenia saginata* NO  
DIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P377n  
2016

Peixoto, Rafaella Paola Meneguete dos Guimarães, 1986-  
Novos peptídeos e antígeno recombinante de *Taenia  
saginata* no diagnóstico da cisticercose bovina / Rafaella Paola  
Meneguete dos Guimarães Peixoto. – Viçosa, MG, 2016.  
xi, 90f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bovino - Doenças. 2. Cisticercose bovina. 3. *Taenia  
saginata*. 4. Doenças parasitárias. 5. Zoonoses. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de  
Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

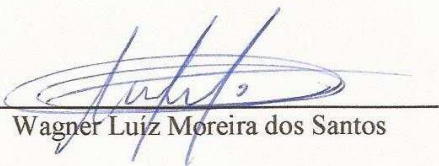
CDD 22 ed. 636.2089696

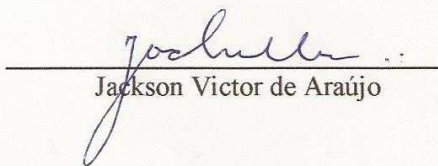
RAFAELLA PAOLA MENEGUETE DOS GUIMARÃES PEIXOTO

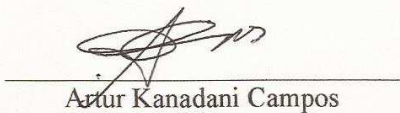
**NOVOS PEPTÍDEOS E ANTÍGENO RECOMBINANTE DE  
*Taenia saginata* NO DIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA**

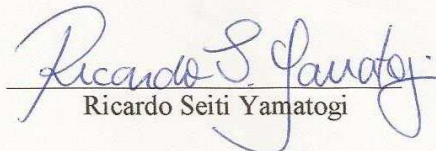
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

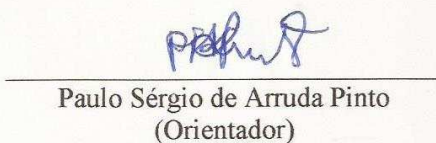
APROVADA: 28 de setembro de 2016.

  
Wagner Luiz Moreira dos Santos

  
Jackson Victor de Araújo

  
Artur Kanadani Campos

  
Ricardo Seiti Yamatogi

  
Paulo Sérgio de Arruda Pinto  
(Orientador)

*"A persistência é o caminho do êxito"*

*Charles Chaplin*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos aqueles que de maneira direta ou indireta participaram na construção deste trabalho.

Primeiramente aos meus pais, Dulcélia e Mauro, que tanto amo, por me darem todo o suporte e carinho durante essa árdua jornada, e ao meu irmão Philippe.

Ao Frederico Freitas e família, por todo o apoio durante esses longos anos;

À minhas queridas amigas Giselle Dias e Keila Youko Fujii, por todo o carinho;

Às minhas queridas Rayanna Motta, Cristiana Machado, Ana Jota Moreira, sentirei saudades;

À Universidade Federal de Viçosa e em especial ao programa de pós Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade, e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo fornecimento da bolsa de estudos; Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais), pelo apoio financeiro à pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto, pela orientação e confiança. Fico grata pelos ensinamentos por todos esses anos;

Ao meu co-orientador Prof. Abelardo da Silva Júnior, por toda ajuda e incentivo;

À todos os professores que tive a honra de conhecer durante esses anos em Viçosa,

Ao meu ex professor da graduação, Valmir Kowaleski de Sousa por todos os conselhos e amizade;

Ao Stetoslav Todorov, colega de bancada, pelo apoio e conselhos;

À todos meus colegas do setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública (DVT-UFV), especialmente ao Marcus Rebouças Santos (Virologia – DVT), Tiago Zilch (Proteínas-DVT), e a Paula da Fonseca Apolinário (InsPOA-DVT), por toda a ajuda.

A todos os funcionários do Departamento de Veterinária, em especial à Rosinéia por sempre ser tão atenciosa e querida, e aos técnicos Dagoberto e Luís do setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, por toda a ajuda prestada;

Ao Juliano e Adão (Biotério/DVT/UFV), por todas as vezes que foram amigos e solícitos;

Aos amigos do matadouro-frigorífico Argus (São José dos Pinhais – PR): Antônio, Nelson, Zé Bursinski, Dr. Renato Menon, pelo auxílio nas coletas de sangue.

Cada um de vocês foi fundamental para a conclusão dessa etapa.

A todos muito obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS .....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
1. A cisticercose bovina.....	7
2. Prevalência da cisticercose bovina .....	7
2.1.1. Região Sul .....	9
2.1.3. Região Centro Oeste.....	10
2.1.4. Regiões Nordeste e Norte.....	11
3. Resposta imune à cisticercose .....	12
4. Diagnóstico e controle .....	13
5. REFERÊNCIAS .....	17
OBJETIVOS GERAIS .....	25
Objetivos Específicos .....	25
CAPÍTULO 1 .....	26
Novos antígenos derivados de <i>Taenia saginata</i> e desempenho da proteína rqTSA-25 para o diagnóstico da cisticercose bovina .....	26
RESUMO .....	27
ABSTRACT .....	28
1. INTRODUÇÃO.....	29

2. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
2.1. Obtenção do antígeno total de <i>Taenia crassiceps</i> .....	30
2.2. Obtenção dos peptídeos sintéticos .....	31
2.3. Obtenção dos soros-controle e delineamento experimental .....	32
2.4. ELISA – peptídeos .....	33
2.5. Critérios de interpretação e análise dos resultados do ELISA .....	34
2.6. Síntese da proteína recombinante quimera.....	34
2.6.1. Plasmídeo para expressão.....	35
2.6.2. SDS-PAGE indução .....	36
2.6.3. Purificação protéica .....	36
2.7. Análise sorológica da proteína rqTSA-25 .....	37
2.7.1. Ensaio laboratoriais.....	37
2.7.1.1. ELISA com antígeno de <i>Taenia crassiceps</i> .....	37
2.7.1.2. ELISA com a proteína recombinante rqTSA-25.....	38
2.7.1.3. Immunoblot.....	38
2.7.2. Análise dos resultados .....	39
2.8. Comitê de ética.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4. CONCLUSÃO.....	50
5. REFERÊNCIAS .....	51
CAPÍTULO 2 .....	57
Artigo aceito para publicação na Revista Acta Tropica .....	57
Evaluation of a synthetic peptide from the <i>Taenia saginata</i> 18kDa surface/secreted oncospherical adhesion protein for serological diagnosis of bovine cysticercosis .....	57
Abstract.....	59
1. Introduction .....	60
2. Materials and methods.....	61

2.1 Computational characterization.....	61
2.2. Selection and preparation of antigenic peptide .....	62
2.3 Serum samples.....	62
2.4. Indirect ELISA .....	63
2.4.1 Synthetic peptide-based ELISA .....	63
2.4.2. Taenia crassiceps Antigen-based ELISA.....	63
2.5. Determination of test performance .....	64
2.6. Ethics committee approval .....	65
3. RESULTS .....	65
4. DISCUSSION.....	68
5. CONCLUSION .....	70
ACKNOWLEDGEMENTS .....	70
REFERENCES .....	71
CONCLUSÃO GERAL .....	78
ANEXOS .....	79

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Descrição das proteínas de *Taenia saginata*, nomenclatura dos peptídeos e sua sequência de aminoácidos.....32

Tabela 2. Tabela 2. Taxas de desempenho do teste ELISA utilizando diferentes peptídeos de *Taenia saginata* (EP1-EP8).....42

Tabela 3. Reconhecimento como positividade (%) (G1, G2) ou negatividade (G3-G5) das amostras submetidas ao ELISA de acordo com cada peptídeo.....44

### ANEXOS

Tabela 1. Resultado da densidade optica obtida pelo teste ELISA, em diferentes grupos de soro controle (++) amostras experimentalmente infectados, (+) amostras naturalmente infectadas, (-) amostras negativas a cisticercose durante inspeção de rotina, (op) animais negativos para a cisticercose contudo apresentando outras patologias tais como tuberculose, fasciolose ou hidatidose, (is) animais negativos a cisticercose e mantidos sob condições de isolamento, ao analisar: (a) EP1, cutoff =0,881, (b) EP3, cutoff =1,168, (c) EP4, cutoff= 0,846, (d) EP5, cutoff= 0,569, (e) EP6, cutoff=0,599, (f) EP7, cutoff= 0,631, (g) EP8, cutoff= 0,525, (h) rqTSA-25, cutoff= 0,488 .....80

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1. Cassete de expressão do vetor pET-29 a(+) com a proteína rqTSA-25 .....35
- Figura 2. Proteínas de *Taenia saginata* selecionadas para predição dos peptídeos. Em destaque na proteína de 18 kDa: EP1 (azul) EP2 (marrom), proteína de 16 kDa; Proteína de 16 kDa: EP3 (azul), EP4 (amarelo), EP5 (magenta); Proteína de 36 kDa: EP6 (verde), EP7 (vermelho), EP8 (laranja).....40
- Figura 3. Predição dos peptídeos por bioinformática e sua estrutura 3D, em destaque de cor, verifica-se a posição do peptídeo predito .....41
- Figura 4. SDS-PAGE da expressão e purificação da proteína recombinante (25 kDa).1- Marcador de massa molecular. 2-Fração solúvel. 3-Purificação da fração solúvel. 4-Corpo de inclusão. 5-Purificação do corpo de inclusão .....46
- Figura 5. Reatividade ao teste ELISA utilizando como antígeno a proteína rqTSA-25 (a) (Cut off =0,488) e *Taenia crassiceps* (b), antígeno heterólogo (Cut off = 0,359). G1- amostras de sangue de bovinos procedentes de uma propriedade sem histórico de cisticercose, que foram infectados experimentalmente; G2- amostras de animais naturalmente infectados, cujo diagnóstico da cisticercose foi realizado durante a inspeção post-mortem conduzida na rotina de matadouros-frigoríficos supervisionados por serviço oficial de inspeção; G3- amostras de bovinos negativos para cisticercose e outras doenças abatidos sob as mesmas condições dos animais do grupo 2; G4- amostras de soro bovino também negativos para a cisticercose e criados sob isolamento ambiental, em condições sanitárias controladas desde o nascimento, quanto ao controle da cisticercose; G5- amostras de bovinos negativos para a cisticercose, contudo apresentando outras doenças (tuberculose, hidatidose e fasciolose), diagnosticadas ao abate sob as mesmas condições dos animais do grupo 2 .....48

Figura 6. Evolução da resposta imune de sete bovinos infectados experimentalmente com ovos de *Taenia saginata*, utilizando o ELISA contra o antígeno de rqtSA-25 e *Taenia crassiceps* .....49

Figura 7. Amostra soro-controle positivas (primeira amostra de cada linha) e negativas (segunda amostra de cada linha), respectivamente, dentro de cada grupo. Linha 1: Amostras de soro bovino experimentalmente infectadas; Linha 2, amostras de soro bovino naturalmente infectados; Linha 3, amostras de soro bovino negativos a cisticercose durante inspeção de rotina; Linha 4, amostras negativas a cisticercose bovina durante inspeção de rotina, mas que apresentaram outras patologias (tuberculose, fasciolose ou hidatidose) .....50

## CAPÍTULO 2

Figure 1. Three-dimensional model of the 18 kDa protein. (a) Overlapping of predicted models by I-TASSER (in blue) and Phyre2 (in green). In translucent silver, the N-terminal structure modeled by I-TASSER and not considered in this study. (b) Localization of the predicted epitope EP1 (in red). In blue, the putative sites of N-glycosylation (ASN74 and ASN92) and O-glycosylation (THR116) .....66

Figure 2. Reactivity of bovine serum samples in the ELISA test and cut-off (dotted line). Assays conducted using (a) EP1 peptide as an antigen (Cut off + 2 SD= 0,881); (b) *Taenia crassiceps* heterologous antigen (Cut off + 2 SD= 0,359) .....67

## RESUMO

GUIMARÃES PEIXOTO, Rafaella Paola Meneguete dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2016. Novos peptídeos e antígeno recombinante de *Taenia saginata* no diagnóstico da cisticercose bovina. Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

A cisticercose bovina é uma doença de caráter zoonótico que acarreta prejuízos tanto de ordem sanitária quanto de ordem econômica. Tradicionalmente seu diagnóstico é realizado durante a inspeção post mortem em matadouros-frigoríficos sob fiscalização sanitária, e consiste basicamente na visualização macroscópica através de cortes realizados em grupos musculares preditos como preferenciais para a implantação dos cisticercos. Ressalta-se que este método apresenta deficiências de desempenho, deixando passar despercebidas formas discretas da doença. Essa pesquisa foi desenvolvida com a meta de aprimorar o diagnóstico da cisticercose bovina, e sobretudo, dos testes sorológicos atualmente desenvolvidos, aumentando a confiabilidade do diagnóstico. A pesquisa caracterizou-se pela seleção de oito peptídeos sintéticos e desenvolvimento de uma proteína quimera recombinante com alto potencial no diagnóstico da cisticercose bovina. Foram selecionadas três diferentes proteínas de *Taenia saginata* (GenBank) (18 kDa oncosphere antigen [*Taenia saginata*]; Antigen TSA16 [*Taenia saginata*]; Antigen TSA36 [*Taenia saginata*] Heat shock protein 20 homolog [*Taenia saginata*]), e realizada a predição de oito peptídeos (EP1-EP8) selecionados por diferentes programas de bioinformática. Após sintetização e análise do desempenho dos peptídeos pelo ELISA, foram selecionados os três peptídeos que alcançaram melhores resultados (EP1, EP4 e EP6) para compor uma proteína recombinante quimérica, que posteriormente foi denominada de rqTSA-25. A proteína rqTSA-25 obteve as seguintes taxas de desempenho no ELISA: sensibilidade de 88% (IC=76-94%), especificidade de 96% (IC=84-99%), valor preditivo positivo 96% (IC=86-99%), valor preditivo negativo 87% (IC=74-94%) e acurácia de 92%, sendo que, ao submeter diferentes amostras de soro grupo controle ao teste imunoblot, não foi verificada nenhuma reação falso positiva ou falso negativa. Dessa forma, destaca-se a inovação na produção da proteína rqTSA-25 e seu alto desempenho relatado, sendo um importante aliado na melhoria do teste diagnóstico sorológico para o diagnóstico da cisticercose bovina.

## ABSTRACT

GUIMARÃES PEIXOTO, Rafaella Paola Meneguete dos, D.Sc., Federal University of Viçosa, September, 2016. New peptides and recombinant antigen from *Taenia saginata* for diagnosis of bovine cysticercosis. Adviser: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Bovine cysticercosis is a zoonotic disease that causes losses both for health and economic order. Traditionally the diagnosis is performed during the post-mortem inspection in slaughterhouses under sanitary inspection, and consistent basically in macroscopic visualization by means of cuts carried out in predicted muscle groups such as preferred for the implementation of cysticercosis. It is emphasized that this method has performance deficiencies, leaving pass unnoticed discrete forms of the disease. This research was developed with the goal of improving the performance of the diagnosis of bovine cysticercosis and serologic tests currently developed, allowing the presence of cysticercosis in live animals and increasing the reliability of the diagnosis. The research was characterized by the selection of synthetic peptides and development of a recombinant chimera protein with high potential for diagnosis of bovine cysticercosis. First, three different proteins were selected from *Taenia saginata* (GenBank) (18 kDa oncosphere antigen [*Taenia saginata*]; Antigen TSA16 [*Taenia saginata*]; Antigen TSA36 [*Taenia saginata*] Heat shock protein 20 homolog [*Taenia saginata*]), being carried out the prediction of eight peptides (EP1-EP8) with antigenic power by different bioinformatic programs. After synthesis and performance analysis of peptides by ELISA test, we selected three peptides that have reached the best performance rates (EP1, EP4 and EP6) to compose a chimeric recombinant protein, subsequently named rqTSA-25, which was inserted into pET 29a (+) for subsequent expression in bacterial system. The rqTSA-25 protein allowed the following performance ratios by ELISA: sensitivity 88% (CI = 76-94%), specificity 96% (CI = 84-99%), positive predictive value 96% (CI = 86-99%), negative predictive value 87% (CI = 74-94%) and 92% accuracy, and subjecting different samples of serum control group to immunoblotting, it was not found any false positive reaction or false negative. Thus, first it stands out of innovation in the production of rqTSA-25 protein and its reported performance, combined with important improvement in the serologic test for the diagnosis of bovine cysticercosis.

## INTRODUÇÃO

As atividades agropecuárias merecem destaque para a economia do país, pois sustentam o mercado de carnes que está em constante crescimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO) o complexo teniose-cisticercose compõe a relação das doenças tropicais negligenciadas (ROSTAMI et al., 2015), justificando o seu estudo em diagnóstico e controle. O Brasil, como grande exportador de carnes e derivados necessita cada vez mais assegurar a qualidade e a segurança sanitária dos produtos comercializados.

A cisticercose bovina é uma enfermidade de distribuição mundial de caráter zoonótico, causada pela forma larval da *Taenia saginata*. Atualmente, é considerada um dos grandes problemas de saúde pública e animal, e está amplamente difundido no Brasil, sendo motivo de preocupação para frigoríficos e produtores devido aos prejuízos que acarreta (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2012). No Brasil, a prevalência reportada para essa doença gira em torno de 1,05%, variando entre os Estados da Federação (DUTRA et al., 2012). Os prejuízos acarretados pela cisticercose são significativos, pois engloba tanto o setor econômico quanto o de saúde pública, destacando que ainda não houve sucesso no seu processo de controle no panorama nacional.

Analisando bovinos abatidos no Estado do Paraná, entre o período de 2004 e 2008, Guimarães-Peixoto et al. (2012) estimaram prejuízos de cerca de 120 milhões de reais advindos da sua condenação por cisticercose

Usualmente o diagnóstico da cisticercose bovina é realizado durante a inspeção post mortem em estabelecimentos de abate, e consiste basicamente na análise macroscópica em cortes padronizados nos sítios musculares previamente selecionados, sendo estabelecido no artigo 176 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1952; BRASIL, 1971). A carcaça é inspecionada por inteiro para a pesquisa de diversas doenças, sendo realizada nas diferentes linhas de inspeção, contudo, a pesquisa por cisticercos envolve principalmente a análise dos músculos masséters e pterigóideos externos e internos, língua, coração e diafragma, preditos como preferenciais para implantação dos cisticercos.

Diversos autores relatam a necessidade de implementação de um recurso complementar ao diagnóstico de rotina, visando aumentar sua eficiência (GUIMARÃES-

PEIXOTO et al., 2015a; MONTEIRO et al., 2008), pois o exame post mortem ainda apresenta deficiências na detecção de animais com baixo grau de parasitismo (BAVIA et al., 2012; PAULAN et al., 2013) e sobretudo na detecção de carcaças monocisticercósicas. Atualmente vêm-se empregando o teste ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay) como uma ferramenta no diagnóstico complementar para o controle da cisticercose animal e também humana, contudo, ainda torna-se necessário padronizar uma técnica que otimize alto índice de sensibilidade e especificidade (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2015a; MONTEIRO; PINTO; DIAS, 2006; PINTO et al., 2000a). O teste ELISA também pode ser empregado para rastreamento epidemiológico da cisticercose (DUPUY et al., 2015), sendo possível determinar a prevalência da cisticercose numa determinada área e assim entrar com medidas sanitárias preventivas e evitar depreciação excessiva da carcaça.

A utilização de proteínas recombinantes constitui uma alternativa promissora para o diagnóstico da cisticercose humana e animal, dada a dificuldade na obtenção de material biológico necessário para a preparação de antígenos nativos, que ainda são responsáveis por algumas reações falso-positivas ou falso-negativas no imunodiagnóstico, conforme alertam Guimarães-Peixoto et al. (2015a) e Silva et al. (2015a).

No diagnóstico da cisticercose, existem similaridades entre as proteínas obtidas de diferentes regiões do cisticerco e tênias estudadas, facilitando assim sua utilização por homologia. De início, bibliotecas de expressão de cDNA foram construídas a partir de mRNAs isolados no estágio de oncosfera ou cisticerco de *T. crassiceps* (FISCHER, 1994; HERNÁNDEZ et al., 2000; MANOUTCHARIAN et al., 1996; ZARLENGA; RHOADS; A1-YAMAN, 1994), de *T. ovis* (PLANCARTE et al., 1999), de *T. saginata* (BENITEZ et al., 1998; CHAPMAN et al., 1995) e de *T. solium* (GREENE et al., 2000; KALINNA; MCMANUS, 1996).

Visando a otimização do tempo e qualidade do produto final, vem-se empregando proteínas sintéticas, construídas a partir de um banco de dados para o diagnóstico da cisticercose. As proteínas recombinantes de 14 e 18 kDa, obtidas de cisticerco total de *T. solium* (GREENE; WILKINS; TSANG, 1999; PARKHOUSE et al., 2008) e proteínas de 18 kDa de *T. saginata* (FERRER et al., 2003, 2007; GONZÁLEZ et al., 2011), são relatadas como promissoras para o imunodiagnóstico da cisticercose humana e animal.

Dessa forma, visando o aumento do desempenho dos testes diagnósticos, vem-se buscando por novos antígenos que possuam características antigênicas e maior afinidade

com os anticorpos secretados pelo hospedeiro durante os diferentes estádios de infecção. Sendo assim, a pesquisa envolvendo antígenos sintéticos e recombinantes, parece ser uma promissora ferramenta na melhoria do desempenho dos testes diagnósticos, tentando assim, minimizar os prejuízos acarretados pelo complexo teniose-cisticercose, a partir de uma maior precisão do seu diagnóstico, e conseqüentemente diminuindo as perdas relacionadas a saúde pública e economia.

## REFERÊNCIAS

BAVIA, M. E. et al. Estatística espacial de varredura na detecção de áreas de risco para a cisticercose bovina no estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1200–1208, 2012.

BENITEZ, L. et al. Sequence and immunogenicity of the Taenia saginata homologue of the major surface antigen of Echinococcus spp. **Parasitology research**, v. 84, n. 5, p. 426–31, maio 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. p. 154, 1952.

BRASIL-MAPA. **Inspeção de carnes. Padronização de técnicas, instalações e equipamentos. Tomo I: Bovinos**. Brasília, DIPOA/DICAR, 1971. 183p

CHAPMAN, A. et al. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from Taenia solium and Taenia saginata and their use in an egg detection assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1283–8, 1995.

DUPUY, C. et al. Spatial analysis of bovine cysticercosis in France in 2010. **Food Control**, v. 47, p. 348–352, 2015.

DUTRA, L. H. et al. The prevalence and spatial epidemiology of cysticercosis in slaughtered cattle from Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1887–1896, 2012.

FERRER, E. et al. Taenia saginata derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 83–94, 2003.

FERRER, E. et al. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa Taenia saginata oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 517–525, 2007.

FISCHER, C. Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis. **Tropical Medicine Parasitology**, v. 45, p. 324–328, 1994.

GONZÁLEZ, L. M. et al. Genetic variability of the 18 kDa/HP6 protective antigen in *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*: Implications for vaccine development. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 176, n. 2, p. 131–134, 2011.

GREENE, R. M. et al. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. **The Journal of parasitology**, v. 86, n. 5, p. 1001–7, 2000.

GREENE, R. M.; WILKINS, P. P.; TSANG, V. C. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-kDa subunits. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 99, n. 2, p. 257–61, 30 abr. 1999.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R. P. M. et al. Distribuição e identificação das regiões de risco para a cisticercose bovina no estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 975–979, 2012.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R. P. M. et al. Desempenho do ELISA no diagnóstico da cisticercose utilizando bovinos experimentalmente e naturalmente infectados com o metacésteo de *Taenia saginata*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 807–816, 2015.

HERNÁNDEZ, M. et al. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. **Immunology letters**, v. 71, n. 1, p. 13–7, 2000.

KALINNA, B. H.; MCMANUS, D. P. Cloning and characterization of a ribosomal P protein from *Taenia solium*, the aetiological agent of human cysticercosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 219, n. 1, p. 231–237, fev. 1996.

MANOUTCHARIAN, K. et al. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 250, abr. 1996.

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*. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 260–263, 2006.

PAULAN, S. D. C. et al. Usefulness of serological ELISA assay for *Taenia saginata* to detect naturally infected bovines. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2961, p. 270–275, 2013.

PARKHOUSE, R. M. E. et al. TSOL18/HP6-Tsol, an immunogenic *Taenia solium* oncospherical adhesion protein and potential protective antigen. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 921–926, 2008.

PINTO, P. S. A. et al. Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. **Veterinary Parasitology**, v. 88, n. 1-2, p. 127–130, 2000.

PLANCARTE, A. et al. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 4, p. 643–7, abr. 1999.

ROSTAMI, S. et al. Genetic variability of *Taenia saginata* inferred from mitochondrial DNA sequences. **Parasitology Research**, v. 114, n. 4, p. 1365–1376, 2015.

SILVA, L. F. et al. Applicability of ELISA with different antigens to diagnose varying levels bovine cysticercosis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 2013, 2015a.

ZARLENGA, D. S.; RHOADS, M. L.; A1-YAMAN, F. M. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 67, n. 2, p. 215–223, 1994.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. A cisticercose bovina

A cisticercose é uma doença de caráter zoonótico e distribuição mundial, sendo causada pela *Taenia saginata*, que é um parasito pertencente à família Taeniidae classe Cestoidea e a ordem Cyclophyllidea. A sua forma larval causa a cisticercose, que está presente na musculatura de bovinos infectados, e tem como único hospedeiro definitivo o homem, causando-lhe a teniose (REY, 2001).

Quando os ovos de tênia são ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os embriões (oncosferas) se libertam do ovo no intestino delgado pela ação dos sucos digestivos e bile. As oncosferas penetram na parede intestinal e, em 24 a 72 horas, difundem-se no organismo através da circulação sanguínea (GEMMELL et al., 1983). Em seguida, os embriões saem dos capilares sanguíneos e se deslocam para o tecido conjuntivo adjacente às fibras musculares (CARLTON; AVIN, 1998), permanecendo neste até evoluir para a sua forma vesicular, caracterizando o cisticerco.

A teniose é um problema de saúde pública existente tanto em áreas urbanas como rurais onde as condições sanitárias são precárias, favorecendo tanto a transmissão como a manutenção do complexo teniose-cisticercose, pois libera ovos, que são ingeridos pelos bovinos, permitindo que a carne contendo o cisticerco esteja disponível ao consumo humano. Os ovos do parasito se mantêm no meio ambiente por longo período, variando de 4 a 12 meses (HUGGINS et al., 1989), através da contaminação de pastagens por fezes humanas (SILVA; SILVA, 2007).

### 2. Prevalência da cisticercose bovina

A cisticercose bovina tem distribuição mundial, e sua prevalência é dependente do nível das condições socioeconômicas dos países, sendo relatada uma maior prevalência em países em desenvolvimento quando comparado a países desenvolvidos. A prevalência varia de muito baixa (0.03%) na América do Norte e Europa, para elevada, na África e América Latina (10%-80%) (WHO/FAO/OIE, 2005).

Dorny et al. (2000), analisaram 1164 amostras de soro bovino provenientes da Bélgica, e detectaram uma ocorrência de 3,09% no exame sorológico em comparação ao exame post mortem que foram detectadas somente 0,26%. Allepuz et al. (2012) utilizando

exame sorológico detectaram uma prevalência de 1,11% em bovinos abatidos no nordeste da Espanha.

Um estudo foi conduzido em matadouro-frigorífico localizado em Awassa (Etiópia) e do total de 400 carcaças examinadas 26,25% estavam parasitadas por cisticercos (ABUNNA et al., 2008), enquanto na Zâmbia a prevalência relatada foi de 6,1% ao analisar 628 amostras de soro (DORNY et al., 2002). No Irã foi relatado uma prevalência de 0,25% de cisticercose bovina (KHANIKI et al., 2010).

Uma das principais aplicações dos recursos diagnósticos laboratoriais da cisticercose é a identificação do seu quadro epidemiológico em diferentes regiões. Para conhecimento da atual situação epidemiológica no Brasil, é necessário delimitar regiões com maior prevalência da cisticercose, por levantamentos epidemiológicos realizados por meio dos registros em matadouros-frigoríficos, ou principalmente, em estudos realizados a campo no setor pecuário, que estimam a real prevalência com maior precisão. Esses últimos dependem exclusivamente dos recursos laboratoriais, atualmente disponíveis por meio dos testes imunológicos como ELISA e imunoblot (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2015a; SILVA et al., 2015a, 2015b). Embora sejam a principal base de dados para verificação da prevalência bovina no Brasil, os registros da inspeção de rotina podem não estimar a real prevalência da doença, ocultando casos positivos da doença, principalmente nas formas discretas, com baixos números de cisticercos visíveis macroscopicamente, que são os predominantes (MINOZZO et al., 2002).

No Brasil, os dados mais consistentes de ocorrência começaram a surgir nos anos de 1946 e 1947 na Região Central onde foram registradas incidências de 1,0% e 1,5% de cisticercose bovina (FITERMAN, 2005), sendo classificada como disseminada por todo território nacional no ano de 1985 (UNGAR; GERMANO, 1991a, 1991b). Nessas décadas, os resultados observados por diversos autores tem mostrado taxas ascendentes de cisticercose bovina em frigoríficos no Brasil variando de 0,7% a 5,3%, segundo Schein et al. (2004).

Reis et al. (1996) estudaram seis estados do Brasil (Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Pará, Tocantins e São Paulo) no período de 1979 a 1993, e constataram uma variação de frequência de 0,35% a 4,07%, pela análise de dados de 336.723 bovinos, com uma prevalência de 1,87% de casos de cisticercose. Já, Fernandes, Buzzeti (2001), analisaram 1.976.824 bovinos no período de janeiro de 1990 a junho de 2000, em estabelecimento com SIF em Araçatuba (SP) e encontraram uma prevalência de 4,18%; nesse caso os animais eram procedentes de vários Estados Brasileiros, tais como: São

Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Rondônia, Tocantins e Santa Catarina.

## **2.1. Prevalência da cisticercose nas regiões do Brasil**

### **2.1.1. Região Sul**

Em um estudo retrospectivo no Estado do Paraná Zampini (1994), encontrou a prevalência de 2,79% de cisticercose bovina analisando dados do período de 1982 a 1988. Já no ano de 2000, a partir de um levantamento epidemiológico realizado em frigorífico sob inspeção federal, Souza et al. (2007) encontraram um índice de 3,82% de animais com cisticercose, e posteriormente, Guimarães-Peixoto et al. (2012) relataram a prevalência da cisticercose bovina em 2,23% ao analisar o período de 2004-2008.

Falavigna-Guilherme et al. (2006), realizaram um estudo observacional em matadouro-frigorífico de bovinos e suínos sob SIF, localizado em Sabáudia (PR) no ano de 2004 e encontraram 9,3% dos animais parasitados. Em Santa Catarina, foi determinada uma frequência de 1,40% de cisticercose ao analisar 19.702 bovinos, por meio de dados de um matadouro-frigorífico sob Serviço de Inspeção Estadual durante o ano de 2006 (NUNES, 2008).

Mazzutti; Cereser; Cereser (2010), determinaram a ocorrência da cisticercose bovina entre os anos de 2005 a 2010 em matadouros-frigoríficos sob fiscalização do SIF no Estado do Rio Grande do Sul, determinando uma frequência da enfermidade em 1,09%.

### **2.1.2. Região Sudeste**

Santos (1993), estudou a prevalência dessa zoonose durante cinco anos (1988 a 1992) a partir de 520.973 animais oriundos do Brasil Central pecuário e inspecionados com procedimentos padronizados. As taxas de prevalência encontradas foram de 4,19%, 4,68%, 4,97%, 3,54% e 3,24%, para os anos de 1988, 1989, 1990, 1991 e 1992, respectivamente. Segundo o autor, a situação do complexo teniose-cisticercose parece ser pouco conhecida no Brasil, em virtude, possivelmente, da escassa ou falha na divulgação dos dados obtidos, tanto pelos serviços de inspeção quanto pelos laboratórios de saúde coletiva, contribuindo, também a ausência de um programa de controle, os autores admitiram ainda, que a ocorrência da cisticercose no país é superior aos dados publicados.

Fukuda (2003), em um estudo epidemiológico retrospectivo abrangendo o período entre os anos de 1980-2001, constatou que a média de ocorrência da cisticercose bovina em abatedouros sob inspeção federal no Estado de São Paulo foi de 4,28%. O estudo envolveu 33.840.531 bovinos. Em contrapartida Manhoso; Prata (2004) registraram uma prevalência média de 7% para o mesmo estado no período de janeiro de 1999 a julho de 2001.

Nieto et al. (2012b) analisaram a zona rural do município de Matias Barbosa - Minas Gerais e observaram uma prevalência de 0,9% de animais com cisticercose bovina detectados por teste sorológico. Da mesma forma, Santos et al. (2013) estimaram a prevalência da cisticercose bovina na zona rural do município de Viçosa, e detectaram 0,49% de prevalência, e Felipe et al. (2014) detectaram 1,1% de bovinos positivos para a cisticercose no município de Divinésia.

No estado do Rio de Janeiro, (Pereira; Schwanz; Barbosa (2006), ao realizarem um levantamento a partir de 494.620 animais abatidos no período de 1997 a 2003 a prevalência de 1,95%. (Garcia et al. (2008), verificaram a ocorrência de cisticercose em matadouro-frigorífico de bovinos do Estado do Rio de Janeiro entre os anos de 2003 e 2004, sendo possível observar uma frequência de 2,02% de cisticercose nos animais em 2003 e em 2,67% em 2004.

No Estado do Espírito Santo, Galvão (2008), estabeleceu a prevalência de cisticercose em 2,18%, analisando dados de ocorrência da cisticercose em 12 abatedouros sob inspeção estadual no ano de 2007. Nieto et al. (2012a) analisaram registros de três frigoríficos localizados no município de Colatina-ES, e constataram que 43,5% das propriedades amostradas houve detecção para casos da cisticercose nos bovinos.

### 2.1.3. Região Centro Oeste

Ao analisar o período de 1974 a 1979, no Estado do Mato Grosso do Sul, foi encontrado uma prevalência de 1% (SCHENK, 1982). Tornando-se constante quando comparado ao período de 1986 a 1993, onde Carmo (1997) constatou prevalência média de 1,04% de casos de cisticercose. No Centro-Oeste brasileiro (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal), foi relatado uma ocorrência de 0,16% ao analisar dados referentes ao ano de 2007 (VOLLKOPFÝ; XAVIER, 2008). No Mato Grosso, durante o

período de 1996 a 2000, 0,69% dos bovinos abatidos em frigoríficos com Inspeção Federal apresentaram lesões compatíveis com cisticercose (SCHEIN et al., 2004).

#### 2.1.4. Regiões Nordeste e Norte

Os estudos epidemiológicos encontrados para as regiões Nordeste e Norte são escassos e, em sua maioria, refletem somente dados provenientes de pesquisas em matadouros, não demonstrando a real prevalência da cisticercose nessas regiões.

Fiterman (2005), estudou casos de condenação por cisticercose em cinco matadouros frigoríficos sob regime de inspeção federal no período de 1999 a 2005. Foram abatidos 1.330.923 bovinos e a prevalência média de casos positivos variou de 0,82% a 1,23 %. Arçari (2008), investigou os casos de cisticercose bovina em matadouro-frigorífico com inspeção federal no município de Teixeira de Freitas (BA); no estudo, foram inspecionadas 92.944 carcaças durante o ano de 2007, apresentando 0,91% de carcaças parasitadas por cisticercose.

Santos et al. (2008), determinaram a prevalência de cisticercose analisando 142.579 bovinos abatidos em estabelecimento com SIF no município de Jequié (BA). O período analisado foi de agosto de 2004 a julho de 2006 e foi possível constatar uma prevalência de 1,74%. Freitas; Palermo (1996) por meio de estudo retrospectivo no Estado do Pará, encontraram prevalência de 0,0097% para a cisticercose bovina e 0,03657% para teníase humana provocada por *Taenia saginata*.

Oliveira et al. (2011) realizaram um levantamento da prevalência de cisticercose bovina no Estado de Alagoas no período de 2000 a 2005, a partir dos bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal determinando-se a prevalência de 0,32% a 0,65% no Estado.

As informações baseadas em estudos a campo são escassas, existindo poucos estudos disponíveis que estimem a prevalência do complexo teníose-cisticercose, por meio dos testes ELISA e immunoblot (FELIPPE et al., 2014; IASBIK et al., 2010; NIETO et al., 2012a; SANTOS et al., 2013). Dessa forma, pouco se conhece sobre a real situação do complexo teníose-cisticercose no Brasil. Ressaltando que, a não obrigatoriedade da notificação e a ausência de programas de controle na maioria dos Estados, dificultam o conhecimento da atual prevalência desta zoonose.

### 3. Resposta imune à cisticercose

Como mecanismo de proteção contra o hospedeiro, o cisticerco fica revestido por uma parede membranosa na vesícula, que possui proteínas, algumas delas apresentando propriedades antigênicas e estimulando a produção de antígenos específicos. No entanto, estes antígenos não têm maior efeito na proteção contra a doença, uma vez que os cisticercos desenvolvem uma série de mecanismos evasores (PAWLOWSKI; SCHULTZ, 1972).

A imunidade no gênero *Taenia* é predominantemente mediada por anticorpos e, portanto, possuem muitos imunodeterminantes sorológicos com potencial na proteção e diagnóstico da cisticercose (FERRER et al., 2003). De acordo com Flisser et al. (1979), a ausência de anticorpos não pode descartar a ausência da doença, sendo que a resposta humoral contra a cisticercose pode ser curta ou baixa. Em certos casos, a resposta imune do bovino contra a cisticercose pode acontecer de forma tardia, ou então, pode não ocorrer significativamente devido à imunidade passiva adquirida pelo animal (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2015b). O cisticerco possui uma habilidade de sobreviver por um longo período durante a resposta imune do hospedeiro, por meio de secreção de antígenos que afetam a modulação do sistema imunitário do hospedeiro (HARRISON; PARKHOUSE, 1989), habilidade que também é compartilhada pela *Taenia solium* em suínos (SCIUTTO et al., 2007).

Segundo White (2000), o parasito secreta um inibidor de serina protease chamado de taeniaestatina que inibe a ativação do complemento, de linfócitos e a produção de citocinas. A superfície do parasito é recoberta por uma camada de polissacarídeo, que afasta a ativação do complemento da parede do cisto. A paramiosina presente no parasito também inibe a via clássica de ativação do complemento. O parasito produz também prostaglandinas e proteínas de baixo peso molecular que diminuem a inflamação e alteram a produção de citocinas nos linfócitos Th2 auxiliares. O cisticerco secreta proteases que podem degradar interleucinas e imunoglobulinas. Os cisticercos viáveis estimulam a produção de imunoglobulinas, que paradoxalmente aumentam o tamanho do cisto e degradam aminoácidos.

Por meio de infecção experimental em bovinos, Guimarães-Peixoto et al. (2015b) acompanharam a cinética de produção de anticorpos, e observaram que alguns bovinos não apresentam resposta imunológica eficaz contra a cisticercose e/ou podem responder tardiamente à infecção, tratando-se provavelmente de uma proteção discreta. Relatos

atestam que a imunidade contra parasitas Taeniidae é mediada por anticorpos (FERRER et al., 2003; GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2015b; HARRISON; PARKHOUSE, 1989; HARRISON et al., 2005).

#### **4. Diagnóstico e controle**

O diagnóstico da cisticercose bovina é tradicionalmente realizado durante a inspeção post-mortem em matadouros-frigoríficos inspecionados e consiste basicamente na avaliação visual macroscópica de cisticercos nos tecidos e órgãos e vísceras da carcaça, conforme normas técnicas do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1971). Contudo, por razões de natureza estética e comercial, o inspetor normalmente não retalha todo o material submetido à inspeção de rotina ou posteriormente a ela, sendo passível ocorrer uma subestimação da prevalência.

Atualmente o teste ELISA vem sendo utilizado como principal recurso sorológico para avaliar a situação epidemiológica da cisticercose, contudo, seu aperfeiçoamento poderia melhorar a eficiência do diagnóstico da doença, sobretudo nos animais ainda vivos (OGUNREMI; BENJAMIN, 2010). Diversos autores relatam também a necessidade de se pesquisar e implementar o teste ELISA como um método auxiliar à inspeção visual de rotina, com o propósito de aumentar a eficiência no diagnóstico da cisticercose bovina (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2015a; MINOZZO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2008).

A utilização do teste ELISA revelou que a prevalência da cisticercose bovina, realizada por meio da inspeção em matadouros-frigoríficos é subestimada (DORNY et al., 2000), pois o exame post mortem de rotina é considerado um método de baixa sensibilidade, sobretudo em infecções leves (BAVIA et al., 2012; PAULAN et al., 2013). O custo de implementação de uma ferramenta mais sensível para o diagnóstico da cisticercose bovina deve ser relacionado com os benefícios de uma redução dos riscos de infecção humana, tendo um alto potencial para impedir o ciclo de transmissão do complexo teniose-cisticercose, beneficiando também o setor pecuário pela redução das perdas econômicas (ALLEPUZ et al., 2012).

Atualmente, são desenvolvidas pesquisas sobre a utilização do ELISA associado ao exame anátomo-patológico realizado em matadouros-frigoríficos, sendo importante, não somente como uma nova proposta de diagnóstico da doença, mas podendo servir como

uma ferramenta epidemiológica, fornecendo dados da prevalência e das áreas de risco, permitindo o acompanhamento da sanidade dos rebanhos abatidos provenientes de áreas endêmicas (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2015a).

O teste ELISA ainda apresenta falhas no diagnóstico imunológico com antígenos brutos, sendo necessário pesquisar por novos antígenos, e desenvolver protocolos que otimizem o desempenho do teste. É importante ressaltar que, em condições a campo, o bovino ingere menor quantidade de ovos de tênia, e proporcionalmente sua infecção é mais branda, visto que, a intensidade da resposta imune pode ser menor (MINOZZO et al., 2004), e consequentemente, haverá menor quantidade de anticorpos circulantes.

Deve-se destacar também a importância da detecção das carcaças monocisticercósicas, ou seja, aquelas que apresentam somente um cisticerco nos sítios de inspeção rotineira, pois representam cerca de 94% (SOUZA et al., 2007b) das carcaças diagnosticadas com cisticercose nas linhas de inspeção. Lembrando por outro lado, que a detecção de um cisticerco nas linhas de inspeção, não exclui a presença dos cisticercos em outros sítios musculares não inspecionados (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2016). Esse fato, deve ser considerado ao selecionar um teste de diagnóstico auxiliar, visto que, a maior dificuldade de diagnosticar a cisticercose por meio de testes sorológicos são os baixos níveis de anticorpos circulantes em infecções leves (KYVSGAARD et al., 1991; SMITH; SNOWDON; FINLAY, 1991). Nesse sentido, vêm sendo desenvolvidas pesquisas com diferentes antígenos que possam contribuir significativamente na melhoria do desempenho do teste ELISA, sendo eles: antígenos brutos (totais ou parciais) homólogos ou heterólogos à *Taenia saginata*. Entretanto, as pesquisas envolvendo antígenos recombinantes para o diagnóstico da cisticercose bovina são raras.

Quanto ao uso do antígeno homólogo, proveniente de *Taenia saginata*, destacam-se o antígeno de extrato bruto do cisticerco, de membrana e de secreção e excreção. Onyango-Abuje et al. (1996), utilizaram antígeno do líquido vesicular de *Taenia saginata* e detectaram que, do total de animais negativos a inspeção de rotina, 20,6% possuíam antígenos circulantes contra a cisticercose. A utilização de teste ELISA contra anticorpos monoclonais contra o antígeno de secreção e excreção de *Taenia saginata* também é relatada como promissora por alguns autores (VAN KERCKHOVEN et al., 1998; BRANDT et al., 1992; DORNY et al., 2000).

O antígeno heterólogo ao de *Taenia saginata* atualmente mais relatado para o diagnóstico sorológico da cisticercose bovina, é o proveniente de *Taenia crassiceps*, que comumente é utilizado por diversos grupos de pesquisa (MINOZZO et al., 2004;

THOMAZ-SOCCOL et al., 2010; GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2015a; SILVA et al., 2015a). Sendo assim, Silva et al. (2015), utilizaram diferentes variações do antígeno de *Taenia crassiceps*, tais como antígeno total bruto, antígeno total sonicado e antígeno membranar. Foram alcançados valores de sensibilidade oscilando de 40 a 100% (2 SD) e 22,5 a 82,5% de especificidade (2 SD), sendo que, as taxas de desempenho relatadas foram calculadas a partir de amostras dentro do mesmo grupo soro controle, sendo elas: amostras de bovinos experimentalmente e naturalmente infectados para a cisticercose, animais negativos e animais com outras doenças.

Com relação aos antígenos sintéticos e recombinantes, vêm sendo pesquisados os antígenos homólogos e heterólogos à *Taenia saginata*, visto que, algumas proteínas identificadas possuem a mesma função em diferentes tipos de tênia. Genes homólogos aos antígenos de 16 kDa (TSA16) foram identificados em diversas espécies de tênias, inclusive na *Taenia saginata*. A TSA16 tem uma estrutura altamente preservada, que é capaz de codificar um sinal secretório, visto que, a presença de um sinal secretório nesse grupo de antígenos é sugestivo que ele pode ser secretado pelo próprio parasito. Estudos demonstram que o antígeno de 16 kDa está associado com as vesículas secretoras produzidos na oncosfera ativada do cisticerco (GAUCI; LIGHTOWLERS, 2013).

Ferrer et al. (2003) analisaram seis diferentes peptídeos sintéticos para diagnóstico da cisticercose bovina, sendo eles dois peptídeos derivados da oncosfera de cisticerco de *Taenia saginata* (HP6-2 e HP6-3), 2 peptídeos derivados da sequência de *Taenia saginata* homóloga a *Taenia ovis* 45W (Ts45W-1 e Ts45W-5), um peptídeo com similaridade do antígeno de proteção de *T. saginata* e *T. ovis* (Ts45S-10) e um peptídeo derivado da sequência da proteína de superfície homóloga entre *T. saginata* e *Echinococcus* spp (TEG-1). Dessa forma, ficou constatado que somente os peptídeos HP6-2, TEG-1 and Ts45S-10, tiveram uma performance mínima para determinar exposição ou não à *Taenia saginata*. Abuseir et al. (2007) sintetizaram um peptídeo oriundo de HP6-2 e obtiveram sensibilidade de 100% e especificidade de 98% ao analisar amostras de soro bovino coletadas em matadouro-frigorífico.

O principal antígeno de secreção de 18 kDa de oncosferas de *T. saginata* ativadas (HP6- Tsag) oferece uma potencial dupla utilidade, sendo como vacina e alvo para as ferramentas de diagnóstico (FERRER et al., 2007), que foi indentificado por meio de sua reatividade com anticorpos monoclonais (HARRISON; PARKHOUSE, 1989). Bonay et al. (2002), posteriormente demonstraram que o HP6-Tsag serviria como uma molécula de adesão, uma propriedade relacionada à estimulação de anticorpos de proteção, sendo

assim, a presença de anticorpos HP6-Tsag pode não somente indicar exposição ao parasito, mas também pode indicar o grau de resistência a uma infecção secundária (FERRER et al., 2007). Silva et al. (2015b), também ressaltaram a importância de peptídeos de baixa massa molecular de antígenos de *Taenia crassiceps*, como o de 18kDa, no diagnóstico da cisticercose bovina pelo teste do immunoblot.

O conhecimento de peptídeos imunodominantes é um importante aliado para melhoria do desempenho dos testes de imunodiagnósticos, dada a sua estreita relação com a doença, evidenciada pela sua alta afinidade com anticorpos secretados pelo hospedeiro durante a infecção (NOYA et al., 2003). A substituição dos epitopos lineares das proteínas de antígenos, por peptídeos sintéticos é uma excelente estratégia para capturar antígenos específicos aos anticorpos originados nas amostras de soro (ANDRESEN; BIER, 2009). Além disso, novas metodologias computacionais têm alcançado alta precisão no mapeamento de epitopos antigênicos, o que tem facilitado a seleção de peptídeos utilizados no imunodiagnóstico (WANG et al., 2014; ZIMIC et al., 2011).

## 5. REFERÊNCIAS

ABUNNA, F. et al. Bovine cysticercosis in cattle slaughtered at Awassa municipal abattoir, Ethiopia: prevalence, cyst viability, distribution and its public health implication. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 2, p. 82–8, jan. 2008.

ABUSEIR, S. et al. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. **Parasitology Research**, v. 101, n. 1, p. 131–137, 2007.

ALLEPUZ, A. et al. Comparison of bovine cysticercosis prevalence detected by antigen ELISA and visual inspection in the North East of Spain. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 3, p. 393–395, 2012.

ANDRESEN, H.; BIER, F. F. Peptide microarrays for serum antibody diagnostics. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N.J.), v. 509, p. 123–34, 2009.

ARÇARI, A. T. **Cisticercose bovina: uma revisão e estudo com bovinos abatidos em frigorífico com Inspeção Federal no ano de 2007, em Teixeira de Freitas – BA**, Universidade Castelo Branco, 2008.

BAVIA, M. E. et al. Estatística espacial de varredura na detecção de áreas de risco para a cisticercose bovina no estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1200–1208, 2012.

BONAY, P. et al. Genomic and functional characterisation of a secreted antigen of *Taenia saginata* oncospheres. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 269–273, 2002.

BRANDT, J. R. A. et al. A monoclonal antibody-based Elisa for the detection of circulating excretory secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 471–477, 1992.

CARLTON, W. W.; AVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thoson**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1998.

CARMO, R. G. Prevalência da cisticercose bovina no estado do Mato Grosso do Sul. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 50, p. 45–50, 1997.

DORNY, P. et al. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 88, n. 1–2, p. 43–49, 2000.

DORNY, P. et al. A sero-epidemiological study of bovine cysticercosis in Zambia. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 3, p. 211–215, mar. 2002.

FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. et al. Cisticercose em animais abatidos em Sabáudia, Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 950–951, 2006.

FELIPPE, A. G. et al. Características favoráveis ao controle do complexo teníase-cisticercose em uma região rural de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 21, n. 4, p. 243–246, 2014.

FERNANDES, J. O. M., BUZZETI, W. A. S. Prevalência de cisticercose bovina em animais abatidos em frigoríficos sob inspeção federal da 9a região administrativa de Araçatuba, SP. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 87, p. 30–37, 2001.

FERRER, E. et al. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 83–94, 2003.

FERRER, E. et al. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 517–525, 2007.

FITERMAN, I. R. **Sistemas de informação geográfica no estudo da notificação dos casos de cisticercose bovina no Estado da Bahia**. Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, 2005.

FLISSER, A.; PEREZ-MONTFORT, R.; LARRALDE, C. The immunology of human and animal cysticercosis: **A review. Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, n. 5, p. 839–856, 1979.

FREITAS, J. A.; PALERMO, E. N. Complexo teníase-cisticercose. Avaliação parcial da situação no Estado do Pará. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 33, p. 270–275, 1996.

FUKUDA, R. T. **Contribuição ao estudo da epidemiologia da cisticercose bovina na região administrativa de Barretos. Aspectos ambientais e econômicos**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal., 2003.

GALVÃO, G. P. **Importância da inspeção veterinária no abate de bovinos na detecção de *Cysticercus bovis* – um levantamento em abatedouros com Inspeção Estadual no Estado do Espírito Santo no ano de 2007**. Universidade Castelo Branco, 2008.

GARCIA, L. N. N. et al. *Cysticercus bovis* em bovinos abatidos sob serviço de inspeção federal na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro em 2003 e 2004. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 170–171, 2008.

GAUCI, C.; LIGHTOWLERS, M. W. Genes encoding homologous antigens in taeniid cestode parasites: Implications for development of recombinant vaccines produced in *Escherichia coli*. **Bioengineered**, v. 4, n. 3, p. 168–71, 2013.

GEMMELL, M. et al. **Guidelines for surveillance, prevention, and control of taeniasis cysticercosis**. World Health Organization, 1983.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R. P. M. et al. Distribuição e identificação das regiões de risco para a cisticercose bovina no estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 975–979, 2012.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R. P. M. et al. Desempenho do ELISA no diagnóstico da cisticercose utilizando bovinos experimentalmente e naturalmente infectados com o

metacestódeo de *Taenia saginata*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 807–816, 2015a.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R. P. M. et al. Infecção experimental em bovinos: Cinética da produção de imunoglobulinas IgM e IgG contra cisticercose bovina e resposta inflamatória. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 787–796, 2015b.

HARRISON, L. J.; PARKHOUSE, R. M. *Taenia saginata* and *Taenia solium*: reciprocal models. **Acta Leidensia**, v. 57, n. 2, p. 143–52, 1989.

HARRISON, L. J. S. et al. Ag-ELISA and PCR for monitoring the vaccination of cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncospherical adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, n. 2, p. 103–120, 2005.

HUGGINS, D. et al. Teníases. **Pediatria moderna**, v. 24, n. 6, p. 251–252, 1989.

IASBIK, A. F. et al. Prevalência do complexo teníase-cisticercose na zona rural do município de Viçosa, Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1664–1667, 2010.

KHANIKI, G. R. J. et al. Prevalence of bovine cysticercosis in slaughtered cattle in Iran. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 2, p. 141–143, 2010.

KYVSGAARD, N. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Taenia saginata* cysticercosis in cattle. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 32, n. 2, p. 233–41, 1991.

MANHOSO, F. F. R.; PRATA, L. Prevalência de cisticercose bovina na região oeste do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 121, p. 42–49, 2004.

MAZZUTTI, K. C.; CERESER, N. D.; CERESER, R. D. Ocorrência de cisticercose, facioloze e hidatidose em bovinos abatidos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul, Brasil - 2005 a 2010. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, **Anais...** p. 953–955, 2010.

MINOZZO, J. C. et al. Experimental bovine infection with *Taenia saginata* eggs: recovery rates and cysticerci location. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, p. 451–455, 2002.

MINOZZO, J. C. et al. Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra *Cysticercus bovis*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 857–864, 2004.

MONTEIRO, L. L. et al. ELISA test standardization for the diagnosis of bovine cysticercosis employing *Taenia crassiceps* metacestode antigens. **Revista Brasileira Ciências Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 45–49, 2008.

NIETO, E. C. A. et al. Prevalência do complexo teníase-cisticercose na zona rural de Matias Barbosa-MG. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2307–2314, 2012a.

NIETO, E. C. A. et al. Análise de fatores de risco para a infecção de cisticercose bovina: Estudo de caso controle a partir de animais abatidos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2359–2366, 2012b.

NOYA, O. et al. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 4, p. 299–308, ago. 2003.

NUNES, R. **Prevalência de cisticercose bovina em matadouro frigorífico sob Inspeção Estadual (SIE) em Santa Catarina**. Universidade Castelo Branco, Curitiba, 2008.

OGUNREMI, O.; BENJAMIN, J. Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1–2, p. 93–101, 2010.

OLIVEIRA, A. W. et al. Estudo da prevalência da cisticercose bovina no Estado de Alagoas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 41–46, 2011.

ONYANGO-ABUJE, J. A. et al. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 61, n. 3–4, p. 221–230, 1996.

PAULAN, S. D. C. et al. Usefulness of serological ELISA assay for *Taenia saginata* to detect naturally infected bovines. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2961, p. 270–275, 2013.

PAWLOWSKI, Z.; SCHULTZ, M. G. **Advances in Parasitology APL**. In: Taeniasis and cisticercosis (*Taenia saginata*). Academic Press, 1972. p. 411.

PEREIRA, M.A.V.C.; SCHWANZ, C. G.; BARBOSA, V. S. Prevalência da cisticercose em carcaças de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro, submetidos ao controle do Serviço de Inspeção Federal. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 83–87, 2006.

REIS, D. O. et al. Cisticercose bovina: 15 anos de ocorrência em animais abatidos em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 43, p. 33–35, 1996.

REY, L. **Parasitologia**. In: Parasitos e doenças parasitárias do homem na América e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 497–515.

SANTOS, I. F. **Um modelo de inspeção para a detecção da cisticercose muscular bovina em matadouros**. Universidade Federal Fluminense, 1993.

SANTOS, T. O. et al. Epidemiological survey of the taeniasis/cysticercosis complex in cattle farms in Vicoso County, Minas Gerais, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 449–452, 2013.

SANTOS, V. C. R. et al. Prevalência da cisticercose em bovinos abatidos sob inspeção federal no município de Jequié, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 132–139, 2008.

SCHEIN, F. B. et al. Prevalência de cisticercose em bovinos abatidos em frigoríficos com Inspeção Federal, no Estado de Mato Grosso. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 71, n. 49, 2004.

SCHENK, P. Prevalência de tuberculose, cisticercose e hidatidose em bovinos abatidos nos matadouros-frigoríficos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (1974/1979). **Comunicado técnico - Embrapa**, n. 5, p. 28–31, 1982.

SCIUTTO, E. et al. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: Protection and injury. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 621–636, 2007.

SILVA, A. A. P.; SILVA, M. V. Teníase na população do bairro Nossa Senhora Aparecida município de Correia Pinto-SC. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p. 143–145, 2007.

SILVA, L. F. et al. Applicability of ELISA with different antigens to diagnose varying levels bovine cysticercosis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 2013, 2015a.

SILVA, L. F. et al. Relevant peptides of *Taenia crassiceps* for the diagnosis of bovine cysticercosis by immunoblot. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 891–898, 2015b.

SMITH, H. J.; SNOWDON, K. E.; FINLAY, R. C. Serological diagnosis of cysticercosis by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay in experimentally infected cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 274–276, 1991.

SOUZA, V. K. et al. Prevalência da cisticercose bovina no estado do Paraná, sul do Brasil: avaliação de 26.465 bovinos inspecionados no SIF 1710. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 675–684, 2007a.

SOUZA, V. K. et al. Regiões anatômicas de maior ocorrência de *Cysticercus bovis* em bovinos submetidos à inspeção federal em matadouro-frigorífico no município de São José dos Pinhais, Paraná, de Julho a Dezembro de 2000. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 92–96, 2007b.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Pesquisa de anticorpos contra *Cysticercus bovis*, por teste ELISA em bovinos de abatedouro. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 2, p. 77–85, 2010.

UNGAR, M. L., GERMANO, P. M. L. Etiopatogenia de cisticercose. **Comunidade Científica**, v. 15, n. 1, p. 43–49, 1991a.

UNGAR, M. L.; GERMANO, P. M. Epidemiologia e controle da cisticercose bovina. **Comunidade Científica**, v. 15, n. 1, p. 15–20, 1991b.

VAN KERCKHOVEN, I. et al. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 4, p. 269–274, 1998.

VOLLKOPFÝ, P. C.; XAVIER, M. M. B. S. Prevalência de cisticercose em bovinos abatidos sob inspeção sanitária em Campo Grande-MS. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, **Anais...** p. 34, 2008

WANG, Y. et al. Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 474, 2014.

WHITE, A. C. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 187–206, 2000.

WHO/FAO/OIE. Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis, 2005.

ZAMPINI, L. M. Cisticercose bovina no Paraná no período de 1982 a 1988. **Higiene Alimentar**, v. 8, n. 30, p. 24–25, 1994.

ZIMIC, M. et al. Immunoinformatics prediction of linear epitopes from *Taenia solium* TSOL18. **Bioinformatics**, v. 6, n. 7, p. 271–274, 2011.

## **OBJETIVOS GERAIS**

Caracterizar e avaliar o potencial diagnóstico de diferentes peptídeos oriundos de distintas regiões da *Taenia saginata*, convergindo os melhores resultados para a produção de uma nova proteína recombinante quimérica, avaliando o desempenho dessa proteína, por meio do teste ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e Immunoblot, visando aumentar as taxas de desempenho dos referidos imunoenaios no diagnóstico da cisticercose bovina.

### **Objetivos Específicos**

- ✓ Caracterizar oito peptídeos ainda não estudados, derivados de diferentes regiões de *Taenia saginata*, com potencial diagnóstico para a cisticercose bovina;
- ✓ Avaliar o desempenho dos novos peptídeos;
- ✓ Desenhar uma nova proteína recombinante quimérica contendo os peptídeos que apresentaram melhor desempenho durante as análises;
- ✓ Produzir o antígeno recombinante em sistema heterólogo de expressão para uso no diagnóstico sorológico;
- ✓ Caracterizar e avaliar o novo antígeno recombinante de *Taenia saginata*, objetivando aumentar as taxas de desempenho dos imunoenaios;
- ✓ Utilizar antígenos recombinantes em testes ELISA indireto e Immunoblot como alternativa de diagnóstico para a cisticercose bovina;
- ✓ Comparar o desempenho do novo antígeno recombinante com o antígeno natural bruto de *Taenia crassiceps*;

## **CAPÍTULO 1**

**Novos antígenos derivados de *Taenia saginata* e desempenho da proteína rqTSA-25  
para o diagnóstico da cisticercose bovina**

## RESUMO

A cisticercose bovina compõe o complexo zoonótico teniose-cisticercose, que é de distribuição mundial sendo causado pela forma larval da *Taenia saginata*, quando presente na musculatura de bovinos; e em sua forma adulta fica albergada no intestino de humanos parasitados, caracterizando a teniose. O diagnóstico é realizado tradicionalmente pela inspeção post mortem em matadouros-frigoríficos sob fiscalização sanitária, consistindo basicamente na visualização macroscópica, palpação e corte nas lesões causadas pelo cisticerco em sítios musculares pré definidos como preferenciais para implantação dos cisticercos, contudo, muitas vezes a carcaça parasitada pode passar despercebida. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é caracterizar e avaliar o desempenho de diferentes peptídeos de *Taenia saginata*, por meio do teste ELISA, bem como produzir e avaliar o desempenho de uma nova proteína recombinante quimérica com alto poder antigênico. Foram selecionadas três regiões distintas da *Taenia saginata* utilizando predição por bioinformática, sendo selecionado oito peptídeos (EP1-EP8). Sendo assim, o desempenho dos peptídeos foi testado individualmente, e selecionados aqueles com desempenho superior (EP1, EP4 e EP6), para compor uma nova proteína recombinante quimérica. A proteína foi denominada de rQTSA-25, alcançando as seguintes taxas de desempenho no ELISA: sensibilidade de 88% (IC=76-94%), especificidade de 96% (IC=84-99%), valor preditivo positivo 96% (IC=86-99%), valor preditivo negativo 87% (IC=74-94%) e acurácia de 92%. No imunoblot, a proteína não revelou qualquer reação falso positiva ou falso negativa. Diante do exposto, recomenda-se a utilização da proteína rQTSA-25 para o diagnóstico da cisticercose bovina.

Palavras-chave: Cisticercose bovina; Proteína recombinante; peptídeo sintético; *Taenia saginata*; diagnóstico

## **ABSTRACT**

Bovine cysticercosis composes the zoonotic complex teniasis-cysticercosis, which is a worldwide distribution and is caused by the larval form of *Taenia saginata* when present in bovine muscles; and its adult form is housed in the intestine of infected humans, characterizing teniose. The diagnosis is made traditionally by inspection post mortem at slaughterhouses under sanitary inspection, and consists basically of the macroscopic visualization of lesions caused by cysticercosis in muscles sites determined as preferred for the implementation of cysticercosis, however, many times parasitized animals can pass unnoticed during this inspection. In this context, the objective of this study is to characterize and evaluate the performance of different peptides from different regions of *Taenia saginata*, using ELISA as well as producing and evaluate the performance of a new recombinant protein chimera derived from the fusion of different peptides with a high power antigen, previously assessed for the diagnosis of bovine cysticercosis. We selected three distinct regions of *Taenia saginata* and through the bioinformatics programs have been predicted eight peptides with antigenic potential (EP1-EP8). Thus, these peptides were analyzed individually, and those who have obtained superior performance to others (EP1, EP4 and EP6), were selected to compose a new chimeric recombinant protein. The new protein was named rqTSA-25 and achieved the following performance rates in the ELISA test: sensitivity 88% (CI = 76-94%), specificity 96% (CI = 84-99%), positive predictive value 96 % (CI = 86-99%), negative predictive value 87% (CI = 74-94%) and 92% accuracy. In the immunoblot, this protein showed no false positive or false negative reaction. Given the above, it is recommended to use the rqTSA-25 protein for the diagnosis of bovine cysticercosis.

**Keywords:** Bovine cysticercosis; recombinant protein; synthetic peptide; *Taenia saginata*, diagnostic.

## 1. INTRODUÇÃO

A cisticercose bovina compõe o complexo zoonótico teniose-cisticercose, causado pela *Taenia saginata*, sendo considerado um dos grandes problemas de saúde pública e animal que está amplamente difundido no mundo e, particularmente no Brasil. Permanece como motivo de preocupação para frigoríficos e produtores rurais devido aos prejuízos que acarreta (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2012). O ser humano é o hospedeiro definitivo da *Taenia saginata* (DORNY; PRAET, 2007), e os bovinos atuam como hospedeiros intermediários, contaminando-se ao ingerirem direta ou indiretamente fezes humanas contendo ovos de *T. saginata* (MONTEIRO; PINTO; DIAS, 2006).

Os prejuízos advindos da ocorrência da cisticercose são diagnosticados somente na fase final da cadeia produtiva, no momento do abate do animal, sendo assim irreversíveis. Guimarães-Peixoto et al. (2015a), estimaram prejuízos advindos da condenação por cisticercose em torno de R\$ 120 milhões de reais, analisando os registros nosológicos do Serviço de Inspeção Federal no Estado do Paraná, entre 2004 a 2008.

Atualmente, diversos autores relatam a necessidade de se pesquisar e implementar o teste sorológico ELISA como método auxiliar à inspeção de rotina, buscando uma maior eficiência no diagnóstico da cisticercose bovina (ALLEPUZ et al., 2012; EICHENBERGER; STEPHAN; DEPLAZES, 2011; MONTEIRO; PINTO; DIAS, 2006; OGUNREMI; BENJAMIN, 2010). Essa indicação vem sendo apoiada por Autoridades de Segurança Alimentar Européia, que recomendam o desenvolvimento e validação de um teste de sorodiagnóstico para a cisticercose bovina, como uma importante ferramenta no diagnóstico de rotina (CLIQUET et al., 2010).

Os principais parâmetros do desempenho (sensibilidade + especificidade) do ELISA para a cisticercose animal já foram relatados por diversos autores (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2015a; MINOZZO et al., 2004; MONTEIRO; PINTO; DIAS, 2006; PINTO et al., 2000b; THOMAZ-SOCCOL et al., 2010), contudo ainda não se alcançaram valores satisfatórios quando o alvo era animais naturalmente infectados, que possuem menos anticorpos circulantes, sendo assim, fica evidente a necessidade de buscar alternativas antigênicas, que possam contribuir para a melhoria do ELISA, possivelmente por meio da associação de técnicas de bioinformática para seleção de proteínas de alta afinidade, da biologia sintética e recentemente da proteômica.

A produção e utilização de proteínas recombinantes e quimeras vêm sendo empregadas em pesquisas de diferentes doenças, tais como os casos de *Toxoplasma gondii*

(BEGHETTO et al., 2006), de *Leishmania infantum* (BOARINO et al., 2005), de peste suína clássica (VAN GENNIP et al., 2000) e também de *Taenia solium*, principalmente com foco na neurocisticercose humana (SAKO et al., 2000), ainda sem ligação com o diagnóstico da cisticercose suína. No diagnóstico da cisticercose bovina, é conhecido que as proteínas antigênicas de larva de *Taenia crassiceps*, sobretudo aquelas de baixa massa molecular têm sido empregadas no diagnóstico imunológico da cisticercose bovina (GIROTTI et al., 2009; SILVA et al., 2015b). A proteína de *Taenia saginata* atualmente mais estudada é a proteína de 18 kDa de oncosfera de cisticerco, denominada HP6 (FERRER et al., 2003, 2007; GONZÁLEZ et al., 2011) ou TSA-18 (JABBAR et al., 2010a; LIGHTOWLERS; ROLFE; GAUCI, 1996), que é uma proteína de adesão da oncosfera dos cisticercos, e vem sendo empregada no diagnóstico das cisticercoses animal e humana (FERRER et al., 2007).

Diante da necessidade de se pesquisar proteínas alvo, que possuam maior afinidade com os anticorpos secretados pelo hospedeiro, visando o aprimoramento dos testes de diagnóstico sorológico, propõe-se nessa pesquisa, caracterizar e avaliar uma nova proteína recombinante quimérica, baseada em diferentes peptídeos de regiões moleculares alvo de *Taenia saginata*, avaliando o seu potencial para o diagnóstico da cisticercose bovina, em comparação com os protocolos desenvolvidos com os antígenos de larva de *Taenia crassiceps*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção do antígeno total de *Taenia crassiceps***

Os antígenos de larva de *Taenia crassiceps* foram obtidos a partir de inoculação intraperitoneal em camundongos BALB/c fêmeas, de acordo com a metodologia descrita por Vaz et al. (1997).

Após coleta, os cisticercos foram congelados (-20°C) e, em seguida, submetidos a diferentes etapas: desidratação por liofilização; trituração dos cisticercos liofilizados; adição de solução salina 0,15M obtendo uma proporção final de 6,5 a 10%; homogeneização, em banho de gelo, com homogeneizador de tecidos (Potter); centrifugação do material obtido a 17.400g/30min/4°C. Ao sobrenadante foi adicionado inibidor de protease (PMSF, Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA, P7626, 0,25M – 10 µl/ml) e o antígeno armazenado (-20°C) até o momento do uso.

## 2.2. Obtenção dos peptídeos sintéticos

Foram selecionados oito peptídeos oriundos de 3 diferentes proteínas da *Taenia saginata* a partir do seguinte esquema: 2 peptídeos derivados da proteína da oncosfera de 18 kDa (GenBank ADO86979.1) de *Taenia saginata*, 3 peptídeos provenientes da proteína do antígeno de 16 kDa – TSA16 (GenBank AFU50753.1) e 3 peptídeos derivados da proteína de 36 kDa (GenBank CAA73114.1) (Tabela 1).

Para predição dos peptídeos, foram utilizados quatro programas de bioinformática, sendo eles: o Bepipred® (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006), método que utiliza a combinação das escalas de hidrofobicidade de Parker (PARKER; GUO; HODGES, 1986), estrutura secundária de Levitt's (LEVITT, 1978) e modelo oculto de Marcovi; O ABCpred®, que utiliza uma rede neural artificial (SAHA; RAGHAVA, 2004), o AAPpred®, que utiliza um escala de antigenicidade de pares de aminoácidos (CHEN et al., 2007) e o ELIPRO® que prediz epítomos descontínuos (conformacionais) por meio da análise de regiões com acessibilidade de solvente e flexibilidade em uma estrutura 3D (PONOMARENKO et al., 2008).

Dessa forma, os dados obtidos compilados pelo programa BioEdit® e selecionadas as sequências de aminoácidos mais recorrentes, que convergiram em: EP1 (WDTKDMAGYGVKKIEV), EP2 (HPRKTWNTTVSVDNGK), EP3 (SGDTSLRSCMHWSHKG), EP4 (VRHVSVSASPVS KPHH), EP5 (GRILLQGLLANTEYVL), EP6 (SIFPTRDSRDLSSRRR), EP7 (IQPREFHPELEYTQPG) e EP8 (SEVQERQLAVKNKEGL), com posterior síntese (Genscript®) com >95% de pureza.

Tabela 1. Descrição das proteínas de *Taenia saginata*, nomenclatura dos peptídeos e sua sequência de aminoácidos.

Descrição das proteínas	Peptídeo	Sequência de aminoácidos
18 kDa oncosphere antigen [ <i>Taenia saginata</i> ]	EP1	WDTKDMAGYGVKKIEV
	EP2	HPRKTWNTTVSVDNGK
Antigen TSA16 [ <i>Taenia saginata</i> ]	EP3	CSGDTSLRSCMHWSHKG
	EP4	CVRHVSVSASPVSKPHH
	EP5	CGRILLQGLLANTEYVL
Antigen TSA36 [ <i>Taenia saginata</i> ] Heat shock protein 20 homolog [ <i>Taenia saginata</i> ]	EP6	CSIFPTRDSRDLSSRRR
	EP7	CIQPREFHPELEYTQPG
	EP8	CSEVQERQLAVKNKEGL

\*Foi adicionado um resíduo de Cisteína nos peptídeos EP3-EP8 para facilitar seu acoplamento com proteínas carreadoras.

### 2.3. Obtenção dos soros-controle e delineamento experimental

As amostras de soros-controle bovinos foram analisadas em cinco grupos distintos, de acordo com o tipo de peptídeo (EP1 a EP8) e tipo (G1 a G5) e número (n) de soros-controle. O grupo 1 (G1) foi composto por amostras de sangue de bovinos procedentes de uma propriedade sem histórico de cisticercose, que foram infectados experimentalmente (GUIMARÃES-PEIXOTO et al., 2015a, 2015b), (EP1-EP2, n=60; EP3-EP8, n=30), considerando amostras em diferentes períodos pós-infecção. O grupo 2 (G2) foi composto de amostras de animais naturalmente infectados, cujo diagnóstico da cisticercose foi realizado durante a inspeção post-mortem conduzida na rotina de abate em matadouros-frigoríficos supervisionados por serviço oficial de inspeção (EP1-EP2, n=60; EP3-EP8, n=30). No grupo 3 (G3) se enquadram amostras de bovinos negativos para cisticercose abatidos sob as mesmas condições dos animais do grupo 2 (EP1-EP2, n=60; EP3-EP8, n=30). Já as amostras de soro do grupo 4 (G4) foram obtidas de bovinos também negativos para a cisticercose e criados em isolamento ambiental, sob condições controladas desde o nascimento (EP1-EP2, n=12; EP3-EP8, n=7). O grupo 5 (G5) foi composto por amostras de bovinos negativos para a cisticercose, contudo apresentando outras doenças (tuberculose, hidatidose e fasciolose), diagnosticadas ao abate sob as mesmas condições

dos animais do grupo 2 (EP1-EP2, n=28, sendo tuberculose n=8, hidatidose n=8, fasciolose n=12; EP3-EP8, n=15, sendo tuberculose n=2, hidatidose n=4, fasciolose n=9).

Para realização do immunoblot, foram selecionadas as amostras distribuídas em cinco grupos de soro controle, descritas a seguir, seguindo as mesmas condições de diagnóstico consideradas anteriormente: grupo 1, composto por amostras de animais experimentalmente infectados (n=15), grupo 2, amostras de animais naturalmente infectados (n=15), grupo 3, animais negativos a cisticercose durante exame post mortem padrão (n=15), grupo 4, animais negativos para a cisticercose e criados em isolamento (n=3) e grupo 5, animais negativos para a cisticercose que apresentaram outras doenças durante exame post mortem de rotina, sendo elas: tuberculose (n=2), fasciolose (n=4) e hidatidose (n=4).

#### **2.4. ELISA – peptídeos**

As diluições ótimas dos reagentes para o ensaio ELISA, utilizando os peptídeos sintéticos como antígenos, foram determinadas previamente por titulação em bloco. Para o EP1 e EP2, houve uma etapa adicional, consistindo em um prévio tratamento da placa de imunoensaio com Polypep® 2% (Sigma P5163) por 10 horas em temperatura ambiente, seguida de três lavagens com PBS pH 7,4. Os peptídeos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,4 (1 µg/mL) e imobilizados em placas de imunoensaio (Thermo. Nunc, Maxisorp), overnight a 4°C. Após três lavagens (solução salina 0,15M, pH 7,4 contendo 0,05% Tween 20) as placas foram bloqueadas (leite desnatado em pó Molico® a 1% em PBS) e incubadas por 1 hora a 37°C. As amostras de soro bovino foram diluídas a 1:25 (EP1-EP2) e 1:100 (EP3-EP8) na solução de bloqueio com Tween 20, durante 1 hora a 37°C. Após lavagens, o anticorpo conjugado com peroxidase contra IgG bovina (A5295, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), foi adicionado na concentração de 1:1.250 (EP1-EP2) e 1:10.000 (EP3-EP8), repetindo os procedimentos de incubação e lavagem. A reação foi revelada com solução de dihidroclorato de o-fenilendiamina (OPD - Sigma P8287, Chemical Co., St Louis, MO, USA) (0,1%) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,003% em tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, durante um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 492nm. A quantidade de reagentes aplicados à placa se manteve em 100µl, exceto para a solução bloqueadora, 200µl.

## 2.5. Critérios de interpretação e análise dos resultados do ELISA

As reações foram analisadas pelo teste ELISA em triplicata obtendo-se a média das densidades ópticas (DO). Os valores de DO obtidos foram ajustados com referência a uma placa padrão, sendo o fator de correção calculado conforme Passos (1993). Na expressão da positividade e negatividade dos resultados pelo teste ELISA, foi considerado o ponto de corte, representado pela D.O. média obtida na análise dos soros-controle negativos, acrescida de dois desvios-padrão. Para cálculo do desempenho do teste foi levado em consideração um intervalo de confiança (IC) de 95%.

Para a determinação das taxas de desempenho do teste ELISA, foram adotados os cálculos da sua sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia, por meio da tabela 2x2, utilizando o seguinte esquema:

	Exame post- morte	
ELISA	+	-
+	a	b
-	c	d

Onde:

Sensibilidade =  $a.100 / a + c$ ; Especificidade =  $d.100 / b + d$ ; Valor preditivo positivo (VPP) =  $a / (a+b)$ ; Valor preditivo negativo (VPN) =  $d / (c+d)$ ; Acurácia =  $a+d / (a+b+c+d)$ .

## 2.6. Síntese da proteína recombinante quimera

Após teste preliminar do desempenho dos peptídeos no ELISA, os três peptídeos com melhor desempenho foram selecionados para a construção de uma proteína recombinante quimera contendo três repetições de cada peptídeo selecionado (EP1, EP4, EP6), fixados por ligante flexível entre si (GGGS)<sup>2</sup> (Registry of Standard Biological Parts – Acesso número: BBa\_K1486003 ([http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K1486003](http://parts.igem.org/Part:BBa_K1486003)) e ligante rígido entre os diferentes peptídeos (EAAAKEAAK) (CHEN; ZARO; SHEN, 2013). Posteriormente, o novo gene foi subclonado em vetor de expressão pET 29a(+) (Genscript®), sendo denominado de rqTSA-25.

### 2.6.1. Plasmídeo para expressão

Inicialmente, foi utilizado o vetor pET-29a(+) para a proteína quimérica. Os vetores pET utilizam promotor do bacteriófago T7 e operador lac, responsáveis pelo controle da transcrição do gene recombinante, a qual induzida por IPTG (isopropiltiogalactosídeo) proporciona altos níveis de produção de proteína. O plasmídeo apresenta também sequência His-Tag com cauda de histidina C-terminal, o que facilita a purificação da proteína expressa por cromatografia de afinidade, em coluna quelante carregada com Níquel. O pET-29a(+) têm ainda um gene de resistência a Kanamicina, que serve como marcador de seleção (Figura 1).

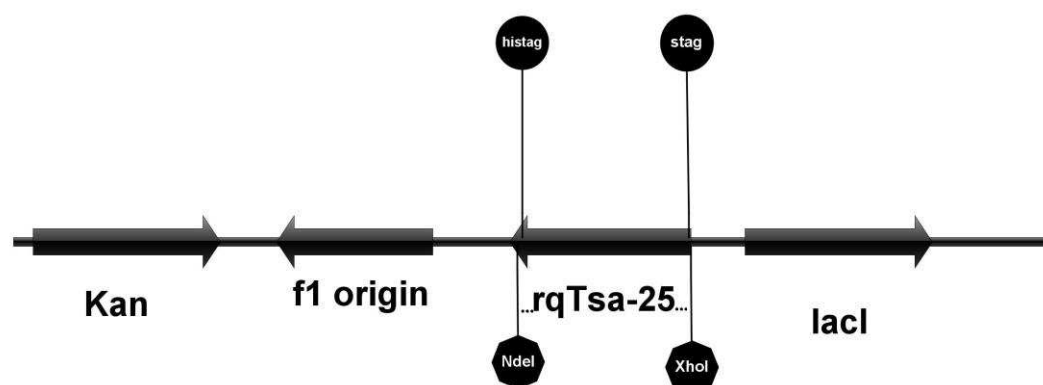


Figura 1. Cassete de expressão do vetor pET-29 a(+) com o a proteína rqTSA-25

O plasmídeo recombinante clonado foi transformado em células *E. coli* da linhagem BL21 CodonPlus (DE3) - RIL (Stratagene, USA), onde a proteína recombinante foi expressa. Após a transformação, as bactérias contendo o plasmídeo recombinante foram cultivadas durante à noite a 37°C/180 rpm em meio LB (Luria Bertani) com 50 ug/mL de kanamicina. As células foram então diluídas 1:100 em meio TB (Terrific Broth, Sigma) com 50 ug/mL kanamicina, e a cultura crescida a 37°C /180 rpm por aproximadamente 4 horas até atingir uma densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) de 0,8-1. Depois de atingida a densidade óptica, foi realizada a indução com IPTG 0,5mM a 30°C/180 rpm, coletando-se alíquotas com 4, 8 e 12 horas após a indução.

### **2.6.2. SDS-PAGE indução**

As amostras coletadas a cada condição foram misturadas com tampão de amostra contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol para posterior análise por SDS-PAGE, para estimar a eficiência e qualidade da expressão da proteína e assim selecionar as condições ótimas para expressão. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 15%, usando um sistema de tampão Tris-glicina. Após a corrida, o gel foi revelado com solução corante de Coomassie Brilhante Blue R- 250 (Sigma) e descorado com solução descorante. De acordo com a análise de seqüências da massa molecular esperada, resultante da proteína recombinante, (incluindo a cauda poli-histidina C-terminal) é de aproximadamente 25 kDa. A expressão foi detectada com o auxílio do marcador de massa molecular (Broad Range 161-0317, BioRad).

### **2.6.3. Purificação protéica**

Primeiramente, o precipitado de células foi ressuspenso em tampão de lise (1g/10mL, NaCl 60 mM, NaCO<sub>3</sub>H 50 mM, pH 7,3). As células foram lisadas em gelo por 12 ciclos de sonicação (Ultrasonic liquid processors S-4000-010, Misonix Inc., NY) de 10 segundos, amplitude de 25mA, cada um com intervalo de 10 segundos para evitar aquecimento da amostra. As células escombros foram removidas por centrifugação a 10.000g a 4°C por 30 min, retirando-se a fração solúvel da proteína. O pellet do corpo de inclusão foi novamente ressuspenso em 10 mL de tampão de lise, acrescido de 8M de uréia e centrifugado durante 15 minutos a 10.000g.

A proteína recombinante foi então purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) usando cauda poli-histidina, com auxílio do FPLC (fast protein liquid chromatography) AKTA PURE (GE Healthcare Bio-Sciences AB). A coluna com HIS-TRAP FF crude 1mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB) foi equilibrada com tampão de lavagem (60 mM NaCl, 50 mM NaCO<sub>3</sub>H, 500 mM Imidazol). A coluna foi carregada com fluxo de 1 mL/min e então lavada com tampão de carregamento (50 mM NaCO<sub>3</sub>H, 60 mM NaCl, 20mM Imidazol). As proteínas ligadas foram então eluídas com tampão de eluição por gradiente de concentração (60 mM NaCl, 50 mM NaCO<sub>3</sub>H, 500 mM Imidazol). O eluato foi coletado tendo como referência o cromatograma.

Alíquotas das frações foram separadas em SDS-PAGE 15% para analisar a sua pureza. A estimativa da concentração total de proteína foi realizada em espectrofotômetro

NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Frações contendo a proteína purificada foram reunidas e estocadas.

## **2.7. Análise sorológica da proteína rqTSA-25**

As amostras de soro bovino foram distribuídas em cinco grupos distintos, com as mesmas especificações das amostras caracterizadas no item 2.3. Na determinação do número de amostras para a análise do desempenho da proteína rqTSA-25 foi utilizado o seguinte esquema: amostras do grupo 1 (n=30) selecionadas aleatoriamente entre diferentes períodos pós infecção, grupo 2 (n=30), grupo 3 (n=30), grupo 4 (n=6) e grupo 5 (n=13). Já, utilizando o antígeno de *Taenia crassiceps* (Tcra) para cálculo do desempenho foi considerada a seguinte relação: grupo 1 (n=60), grupo 2 (n=60), grupo 3 (n=60), grupo 4 (n=12) e grupo 5 (n=28). Posteriormente foi realizada uma avaliação comparativa adicional da resposta imune in vitro dos animais contra rqTSA-25 e Tcra utilizando-se, 35 amostras de bovinos experimentalmente infectados, sendo 7 amostras em cada período pós infecção (Dias 0, 30, 60, 90 e 120).

### **2.7.1. Ensaio laboratoriais**

#### **2.7.1.1. ELISA com antígeno de *Taenia crassiceps***

As placas de poliestireno foram sensibilizadas com os antígenos diluídos (40µg/mL) em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6 estocadas a 37°C durante 1 hora. Após três 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, foi adicionado o anticorpo conjugado com peroxidase contra IgG (A5295, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) (1:5.000), e repetidos os procedimentos de incubação e lavagem. A reação foi revelada com solução de dihidroclorato de o-fenilendiamina (OPD) P8287 (Sigma Chemical Co.; St Louis, MO, USA) a 0,1% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,003% em tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, durante um período de incubação de 5 minutos. A reação foi bloqueada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com

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

#### 2.7.1.2. ELISA com a proteína recombinante rqTSA-25

As diluições ótimas dos reagentes para o ensaio ELISA foram determinadas previamente por titulação em bloco, obtendo-se as melhores condições testadas por ensaios comparativos. O antígeno recombinante foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,4 (1µg/mL) overnight a 4°C e imobilizado em placa de imunoensaio (Thermo. Nunc, Maxisorp). Após três lavagens (solução salina 0,15M, pH 7,4 contendo 0,05% Tween 20) a placa foi bloqueada (leite desnatado em pó Molico® a 1% em PBS) e incubada por 1 hora a 37°C. As amostras de soro bovino foram diluídas a 1:100 na solução de bloqueio com Tween 20, durante 1 hora a 37°C. Após lavagens, o anticorpo conjugado com peroxidase contra IgG (A5295, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), foi adicionado na concentração de 1:10.000, repetindo os procedimentos de incubação e lavagem. A reação foi revelada com solução de dihidroclorato de o-fenilendiamina (OPD) (0,1%) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,003% em tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, durante um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 492nm. A quantidade de reagentes aplicados à placa se manteve em 100µl, exceto para a solução bloqueadora, 200µl. Os critérios de interpretação dos resultados do ELISA seguiram os descritos no item 2.5.

#### 2.7.1.3. Immunoblot

A proteína rqTSA-25, foi utilizada na concentração de 8 µg/ml, e separada de acordo com sua massa molecular por SDS-PAGE 15%, juntamente com o marcador de massa molecular Broad Range 161-0317, BioRad. A proteína, então, foi transferida do gel para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Millipore Corp., USA) de acordo com a metodologia descrita por Towbin et al. (1979). A transferência foi realizada por 2 horas a 4°C, com amperagem fixa de 250mA. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau-S a 0,05% em água bidestilada para visualização qualitativa da transferência.

As membranas foram separadas em tiras de 3 mm de largura e as mesmas lavadas com 0,05% de Tween-20 em solução salina (NaCl 0,15M) e, em seguida, submetidas ao imunodiagnóstico.

As tiras foram dispostas em canaletas de cubas de immunoblot, e tiveram os sítios reativos remanescentes bloqueados com leite em pó desnatado a 5% em Tris-salina pH 7,4, durante 1 hora. Após este período, o excesso da solução de bloqueio foi retirado. As amostras de soros foram adicionadas na diluição de 1:100 em leite em pó desnatado a 1% em Tris-salina pH 7,4 por 1 hora. As tiras foram lavadas com 0,05% Tween-20 em Tris-salina pH 7,4 por seis vezes de cinco minutos cada. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG bovino A-5295 (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA) na diluição 1:10.000, por 1 hora, posteriormente, repetindo os procedimentos de lavagem. As reações foram reveladas com solução cromógena (diaminobenzidina 50 mg/15 ml, 0,15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBS pH 7,4) até evidenciação das bandas reativas das amostras soro-controle. A reação, então, foi interrompida com água destilada. Os reagentes foram adicionados no volume de 1 ml por canaleta da cuba. Todo o teste foi realizado em uma mesa oscilante, com agitação constante e lenta, e em temperatura ambiente (25°C).

#### 2.7.2. Análise dos resultados

A avaliação da eficiência da proteína rqTSA-25 no diagnóstico da cisticercose bovina foi conduzida pela determinação das taxas de desempenho (S, E, VPP, VPN e AC), similarmente ao procedido no item 2.5, seguida de sua comparação com os resultados obtidos com o antígeno de *Taenia crassiceps* e da pesquisa do seu comportamento em diferentes estágios de infecção (item 2.7).

#### 2.8. Comitê de ética

As normas de conduta para o uso de animais em pesquisa do Comitê de Ética do uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa foram seguidas corretamente. As amostras utilizadas nesse trabalho estão estocadas no laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DVT-UFV) e sua utilização foi aprovada em processo do comitê de ética número 20/2011 CEUA/UFV intitulado “Interface da caracterização morfológica de lesões causadas por larvas de *Taenia saginata* com o diagnóstico da cisticercose bovina” (anexo).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, foram selecionadas três proteínas diferentes, oriundas da *Taenia saginata* (36, 18 e 16 kDa) com possível poder antigênico para o diagnóstico da cisticercose bovina. Dessas proteínas foram analisados e selecionados por predição em programas de bioinformática dois peptídeos da proteína de 18 kDa oncosphere antigen [*Taenia saginata*], três da proteína Antigen TSA16 [*Taenia saginata*] e três da proteína de Antigen TSA36 [*Taenia saginata*] Heat shock protein 20 homolog [*Taenia saginata*], como podem ser ilustradas na Figura 2.

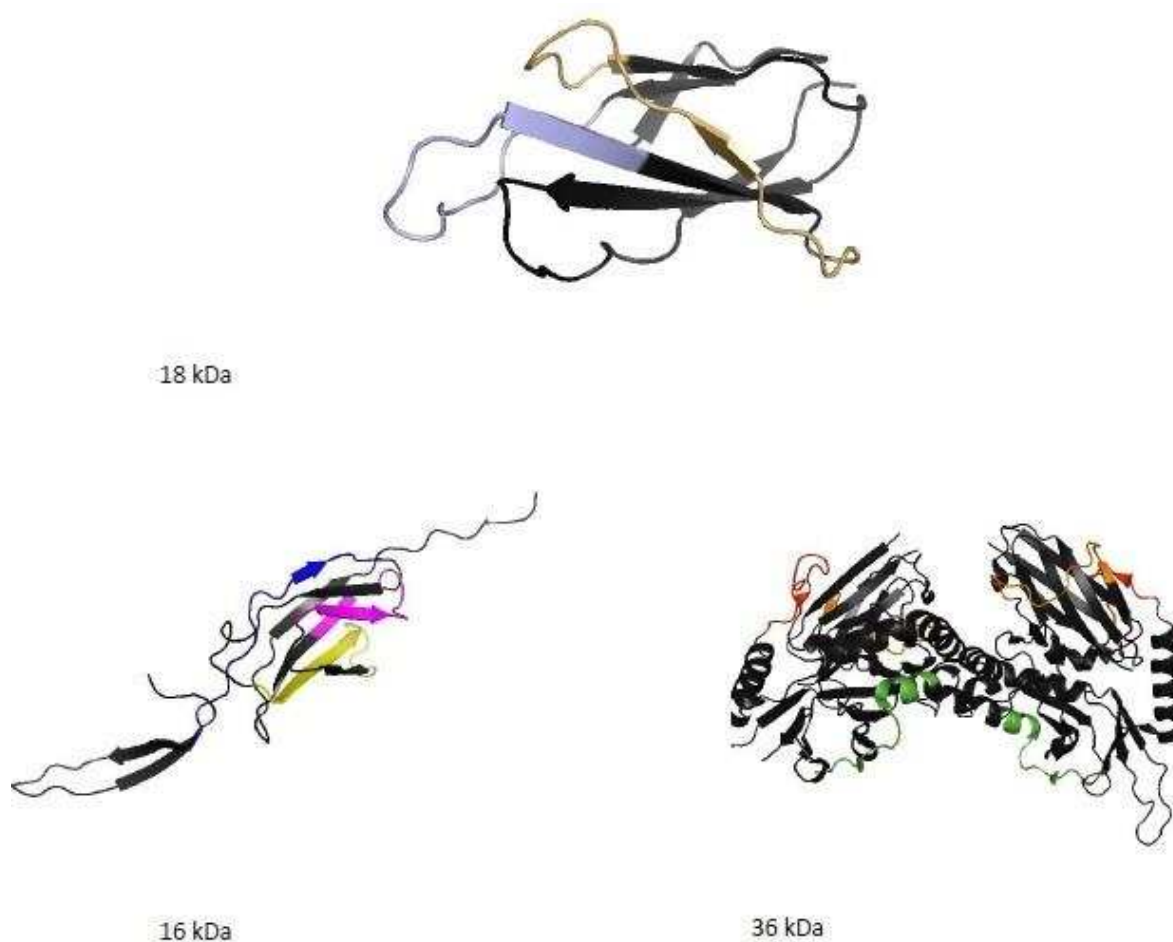


Figura 2 Proteínas de *Taenia saginata* selecionadas para predição e peptídeos preditos (EP1 a EP8). Proteína de 18 kDa com dois peptídeos preditos: EP1 (azul claro) e EP2 (marrom). Proteína de 16 kDa com três peptídeos preditos: EP3 (azul), EP4 (amarelo) e EP5 (roxo). Proteína de 36 kDa com três peptídeos preditos: EP6 (verde), EP7 (vermelho) e EP8 (laranja).

Após predição dos peptídeos e modelagem em 3D, foi possível observar as regiões consideradas mais antigênicas e a presença ou não de sítio de glicosilação preditos. Dessa

forma, o EP1 apresentou-se em sua maioria, exposto ao solvente em folha beta e loop. Da mesma forma, o EP2 apresentou as mesmas características, contudo, acrescido de um sítio de glicosilação em sua porção central. Similarmente, o EP3, EP4 e EP5 e EP8 apresentaram-se em estrutura de folha beta e loop, já, o EP6 e EP7 apresentaram-se em alfa hélice e loop. Todas essas observações podem ser visualizadas em destaque de cor na Figura 3.

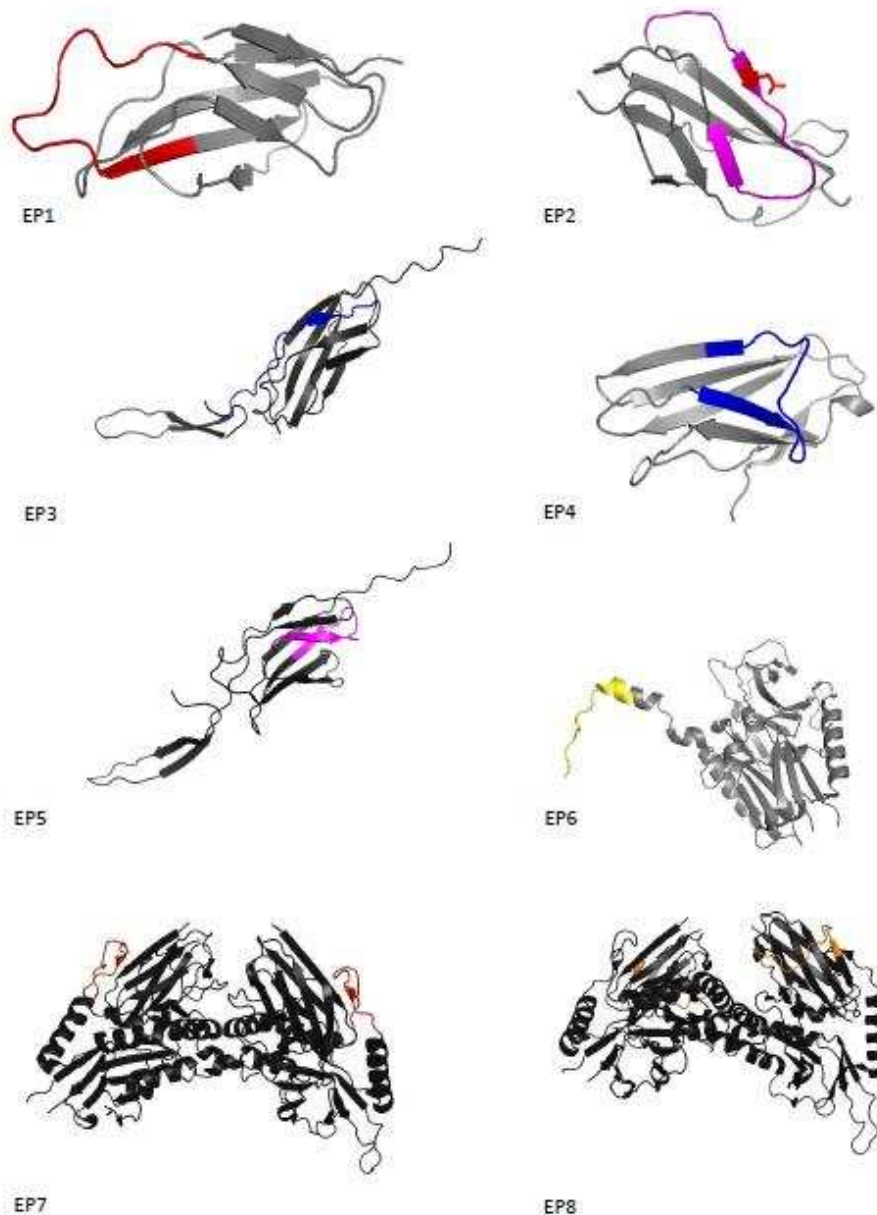


Figura 3. Posições e estruturas 3D dos peptídeos selecionados por predição em bioinformática. Peptídeos EP1 (vermelho) e EP2 (roxo) originados a partir da proteína de 18 kDa; Peptídeos EP3 (azul), EP4 (azul) e EP5 (roxo) a partir da proteína de 16 kDa e peptídeos EP6 (amarelo), EP7 (vermelho) e EP8 (laranja) a partir da proteína de 36 kDa de *Taenia saginata*.

Os peptídeos com poder diagnóstico foram discriminados por meio dos seus desempenhos na interação antígeno-anticorpo por meio do teste ELISA, a partir das taxas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (ACC), descritas na Tabela 2.

Os valores de desempenho do peptídeo EP1, derivado da proteína de oncosfera de 18 kDa, alcançaram os máximos resultados, obtendo-se sensibilidade de 93% (IC=86-96%), e especificidade de 91% (IC=83-95%), mostrando um alto potencial diagnóstico e uma favorável localização na proteína de 18 kDa. O uso da proteína de 18 kDa de *Taenia saginata* tem sido relatado tanto no diagnóstico da cisticercose animal quanto humana, como alvos imunológicos que podem ter dupla utilidade, com aplicações em proteção e diagnóstico do referido parasita (ABUSEIR et al., 2007; FERRER et al., 2003, 2007).

Tabela 2. Taxas de desempenho do teste ELISA utilizando diferentes peptídeos de *Taenia saginata* (EP1-EP8)

Taxas de desempenho (%)	Peptídeos						
	EP1	EP3	EP4	EP5	EP6	EP7	EP8
Sensibilidade	93	60	73	60	85	70	60
Especificidade	91	60	73	56	44	61	73
Valor preditivo positivo	93	63	76	61	64	68	72
Valor preditivo negativo	92	56	70	55	72	64	61
Acurácia	92	60	73	58	66	66	66

\*Não foi possível realizar a padronização do EP2.

Vários estudos têm mostrado que a glicosilação tem grande influência na estrutura, função, antigenicidade e imunogenicidade de glicoproteínas (GOFFARD et al., 2005; HEVEY et al., 1997; OHUCHI et al., 1997a, 1997b). Estudos utilizando a proteína gp120 do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), mostraram que a indução de anticorpos contra essa proteína é influenciada pelas glicosilações, tendo a proteína glicosilada sido incapaz de induzir anticorpos que impedissem a ligação inicial do vírus a células. Em oposição, a proteína sem glicosilações, foi capaz de estimular anticorpos neutralizantes (KOCH et al., 2003; LEKKERKERKER et al., 2004). Levando em consideração que a região da proteína correspondente ao EP2 apresenta um sítio de glicosilação na sua porção central, parece que houve um bloqueio na interação das células do sistema imunológico do hospedeiro com essa região da proteína de 18 kDa na sua forma glicosilada. Sendo assim,

o peptídeo EP2 não mostrou resultado satisfatório no teste ELISA, pois não discriminou amostras positivas das negativas em testes preliminares. Sugere-se então que o bovino infectado pelo cisticerco não apresentaria anticorpos específicos para a região peptídica correspondente ao EP2.

O desempenho relatado para os peptídeos provenientes da proteína de 16 kDa para a sensibilidade e a especificidade foram respectivamente: EP3 com 60% (IC=46-72%) e 60% (IC=45-72%); EP4, 73% (IC=60-83%) e 73% (IC=58-84%), e EP5 com 60% (IC=46-72%) e 56% (IC=41-69%). Nesse grupo, o peptídeo EP4 foi o que apresentou melhor desempenho, pois mostrou as maiores taxas e manteve um equilíbrio entre a sensibilidade e a especificidade, refletindo em uma acurácia do teste de 73%, sendo ainda o segundo peptídeo com melhor desempenho no ranking total das análises. Provavelmente esse fato está relacionado com a localização da proteína de 16 kDa, que está presente na oncosfera ativada do parasito, lembrando que, após ativação do reconhecimento do parasito pelo sistema imune do hospedeiro, são desencadeados anticorpos específicos para combater a infecção, e quando é realizada uma triagem sorológica pelo teste ELISA, essa maior afinidade antígeno-anticorpo reflete em um desempenho superior no teste. De acordo com Jabbar et al. (2010c), há indícios de sinal secretório nesse grupo de antígeno, gerando secreção pelo parasito, demonstrativo de que o antígeno de 16 kDa está associado à vesículas secretoras produzidas pela oncosfera ativada do cisticerco (JABBAR et al., 2010d), que são estruturas associadas à interação parasita-hospedeiro (GAUCI et al., 2006; JABBAR et al., 2010b, 2010c, 2010d).

A partir da proteína Heat shock de 36 kDa, foram obtidos os peptídeos EP6-EP8. A proteína está relacionada à habilidade do parasito desenvolver resposta ao choque térmico do hospedeiro. A resposta ao choque térmico é um mecanismo homeostático geral que protege as células e organismos dos efeitos deletérios estressantes do ambiente em que se encontram. A resposta caracteriza-se por uma rápida ativação transcricional de um conjunto específico de genes que codificam proteínas, conhecido como proteínas de choque térmico (HSPs), estas por sua vez permitem a adaptação do organismo às mudanças de temperatura (FEDER; HOFMANN, 1999; MORIMOTO, 1998). Vale ressaltar que durante os estádios de desenvolvimento do parasito, existem súbitas alterações na temperatura, e a adaptação a essas condições são primordiais para a sobrevivência do parasito e conseqüentemente sua eficaz transmissão (VARGAS-PARADA; SOLÍS; LACLETTE, 2001), concomitantemente, essas regiões estão expostas ao sistema imune do hospedeiro, que é capaz de desenvolver anticorpo com afinidade a

essas proteínas. Os valores de sensibilidade e de especificidade alcançados pelos peptídeos pertencentes a esse grupo foram respectivamente: EP6 com 85% (IC=72-92%) e 44% (IC=30-58%), EP7 com 70% (IC=56-80%) e 61% (IC=47-74%), EP8 com 60% (IC=46-72%) e 73% (IC=58-84%). O EP6 obteve o maior valor de sensibilidade desse grupo, contudo, seu valor de especificidade foi baixo quando comparado aos demais. É importante ressaltar que as amostras representativas dos animais positivos (naturais e experimentais) são procedentes de bovinos em diferentes períodos pós-infecção e em diferentes níveis de infecção. O fato de algumas amostras sabidamente negativas reagirem positivamente no ensaio ELISA utilizando diferentes peptídeos, pode ser atribuído a uma aparente proteção contra a infecção por cisticercos.

Considerando a análise de desempenho de cada peptídeo por grupo de soro controle, destaca-se o comportamento do EP1 que mostrou uma satisfatória diferenciação entre as amostras positivas e negativas, sobretudo quando analisado o G2, quando identificou 92% das amostras positivas, fato que deve ser um importante aliado na melhoria do desempenho de um teste diagnóstico, pois esses bovinos possuem uma baixa concentração de anticorpos circulantes. Em seguida, os peptídeos EP4, EP6 e EP7, acusaram um bom desempenho em comparação aos demais peptídeos analisados (Tabela 3).

Tabela 3. Reconhecimento como positividade (%) (G1, G2) ou negatividade (G3-G5) das amostras submetidas ao ELISA de acordo com cada peptídeo

Grupo soro	Peptídeos						
	EP1	EP3	EP4	EP5	EP6	EP7	EP8
G1	95	50	63	53	86	60	73
G2	92	70	83	66	83	80	46
G3	95	73	83	70	46	50	80
G4	100	57	57	43	57	86	57
G5	82	33	60	33	33	73	66

Outro critério que deve ser levado em consideração, é o reconhecimento ou não, das amostras diagnosticadas como negativas para a cisticercose, durante a inspeção post mortem (G3), lembrando que nesse grupo é possível ser encontrado um número alto de amostras falso negativas, o que conseqüentemente, diminui a taxa de desempenho do teste, visto que, no exame de inspeção de rotina, algumas carcaças parasitadas podem passar despercebidas pelos agentes de inspeção. Ao analisar esse grupo de soro-controle, destaca-

se o desempenho dos peptídeos, em ordem crescente, EP1, EP4 e EP8, que foram capazes de reconhecer em maior quantidade a ausência da cisticercose.

Para a análise da reação cruzada da cisticercose com outras doenças, tais como, tuberculose, hidatidose e fasciolose, foram analisadas as amostras pertencentes ao G5, destacando os peptídeos EP1, EP4 e EP7, que foram os que obtiveram menos reações cruzadas com esse grupo soro-controle. Para o EP1, houve no total cinco reações falso-positivas, sendo elas três amostras de tuberculose, uma fasciolose e uma hidatidose; Com relação ao EP4, houveram seis reações falso-positivas (1 tuberculose, 4 fasciolose e 1 hidatidose) e para o EP7, quatro reações (2 tuberculose, 1 fasciolose, 1 hidatidose).

A principal abordagem na busca de epítomos conformacionais, se utiliza da estrutura tridimensional da proteína em estudo e a inferência de regiões ou resíduos de aminoácidos que interagem com os anticorpos. Nesse trabalho, foram preditos somente epítomos lineares, sendo estes baseados em regiões convergentes entre os softwares e em regiões não descritas em outros estudos. Sendo assim, após análise do desempenho no ELISA, do total de oito peptídeos preditos, três deles se destacaram, sendo eles: EP1, EP4 e EP6, pois obtiveram valores de sensibilidade e/ou especificidade superiores aos demais, demonstrando uma acurácia do teste de 92%, 73% e 66%, respectivamente, posteriormente, sendo selecionados para a composição da proteína recombinante quimérica denominada de rQTSA-25, demonstrando ser um importante aliado na melhoria do desempenho do teste ELISA.

Primeiramente, houve êxito na produção, expressão e purificação da nova proteína recombinante rQTSA-25, como pode ser verificado na Figura 4; em seguida, foi selecionada a fração solúvel purificada para padronização e realização do teste ELISA, verificando seu alto desempenho para o diagnóstico da cisticercose bovina.

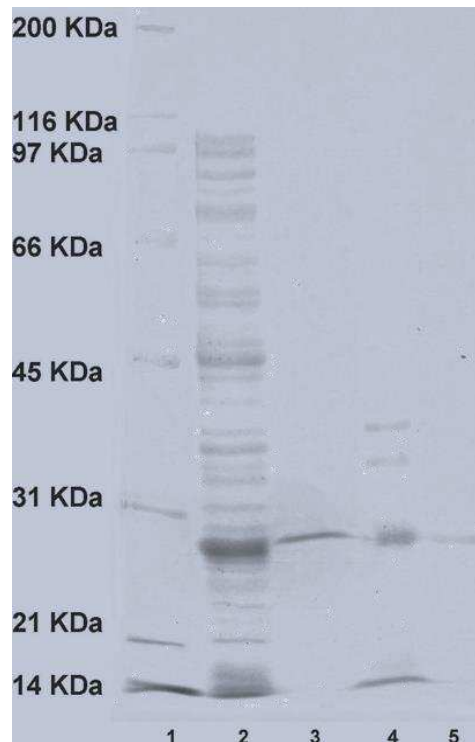


Figura 4. SDS-PAGE da expressão e purificação da proteína recombinante (25 kDa). 1-Marcador de massa molecular. 2-Fração solúvel. 3-Purificação da fração solúvel. 4-Corpo de inclusão. 5-Purificação do corpo de inclusão.

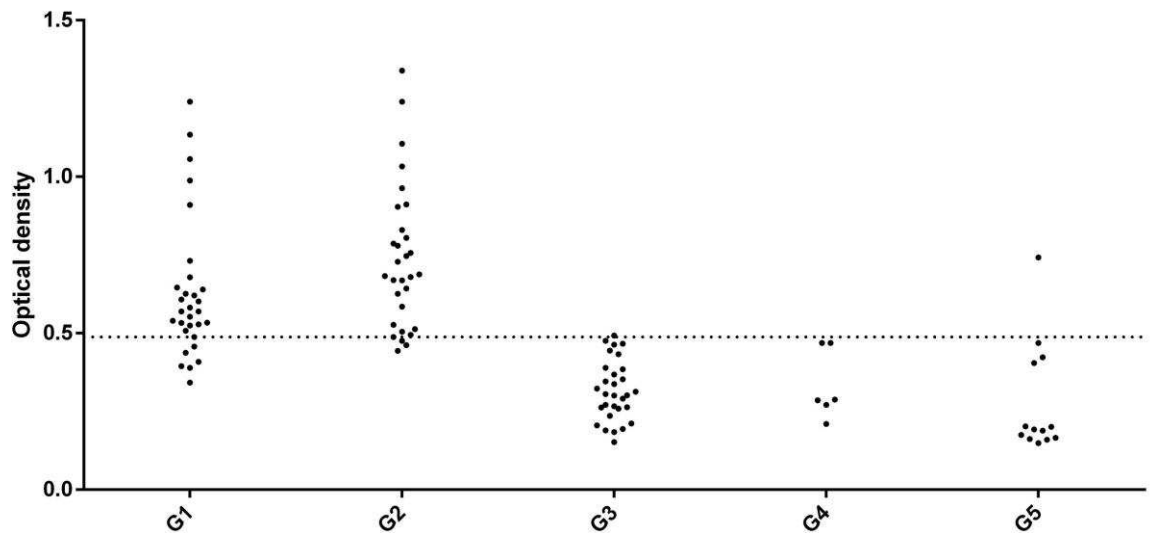
A proteína rqtSA-25 mostrou os seguintes resultados no desempenho diagnóstico da cisticercose bovina: sensibilidade (S) de 88% (IC=76-94%), especificidade (E) de 96% (IC=84-99%), valor preditivo positivo (VPP) 96% (IC=86-99%), valor preditivo negativo (VPN) 87% (IC=74-94%) e acurácia (AC) de 92% (Figura 5a). Esses resultados indicam a diferenciação das amostras positivas das negativas, demonstrando assim o alto potencial diagnóstico da referida proteína no teste ELISA para diagnosticar a cisticercose bovina. Considerando esse alto desempenho diagnóstico e que essa proteína é composta por dois peptídeos derivados da oncosfera do cisticerco e uma proteína de choque térmico, deduz-se que a oncosfera do cisticerco de *T. saginata* secreta proteínas que medeiam sua adesão no parasito, e sendo assim são primeiramente reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro, que por sua vez, produzem anticorpos com alta afinidade contra essas proteínas. Os antígenos imunodominantes das oncosferas, são considerados alvos imunes e podem ter dupla utilidade, com aplicações em proteção e diagnóstico (FERRER et al., 2003). Em sua forma larval, a *T. saginata* expressa proteínas que medeiam a adesão do parasita nas células do hospedeiro (GONZALEZ et al., 2007).

Utilizando o antígeno heterólogo de *T. crassiceps*, obteve-se os seguintes parâmetros de desempenho do teste ELISA: S = 82% (IC= 74-88%), E = 80% (IC=70-

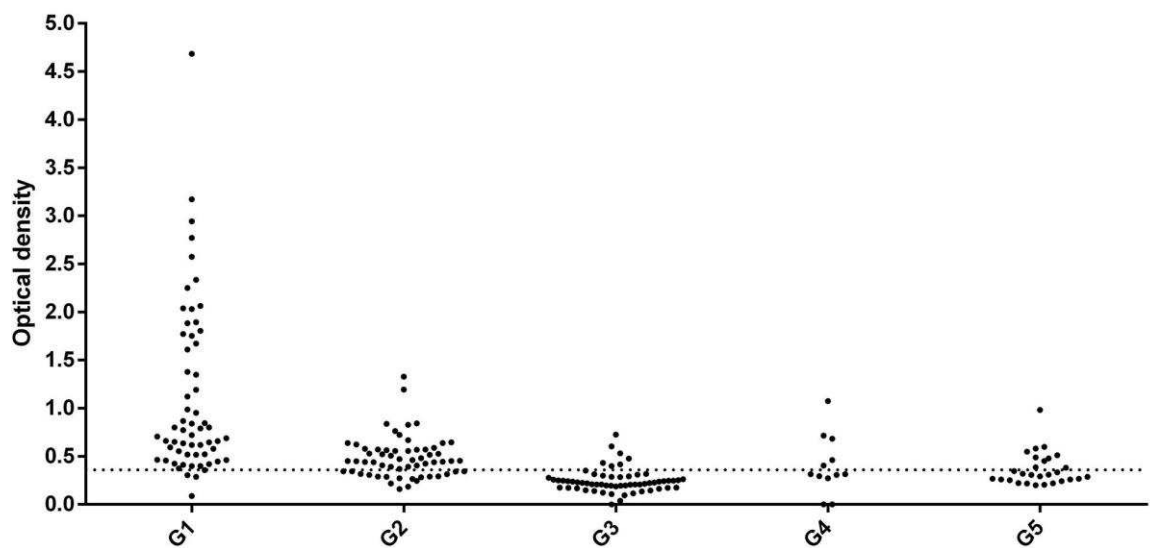
87%), VPP = 83% (IC=74-89%), VPN = 79% (IC=69-86%) (Figura 5b), e acurácia AC = de 81,0%. Os valores alcançados pela rqTSA-25 se mostraram ligeiramente superiores aos do antígeno heterólogo, indicando maior afinidade antígeno-anticorpo e demonstrando ser um importante aliado na melhoria do desempenho do teste diagnóstico. Ainda, a proteína rqTSA-25 foi capaz de reconhecer 96,6% das amostras de animais naturalmente infectados, enquanto o antígeno heterólogo bruto de *Taenia crassiceps* reconheceu 70% das amostras, o que sugere uma grande vantagem da utilização do rqTSA-25 a campo e para um reconhecimento precoce da doença. Outras vantagens da utilização da rqTSA-25 em comparação ao antígeno heterólogo (Tcra) podem ser a sua superioridade de desempenho em casos de animais portadores de cisticercose que foram infectados naturalmente e em casos de bovinos monocisticercóticos, pois esses animais geralmente possuem baixa quantidade de anticorpo circulante, o que dificulta um diagnóstico preciso.

O valor da especificidade do teste ELISA, utilizando como antígeno a proteína rqTSA-25 ficou em 96%, em contrapartida, utilizando a Tcra a especificidade do teste ficou em 80%, isso significa que, ao escolher a proteína rqTSA-25 para desenvolvimento do teste ELISA, será reconhecido um menor número de reações inespecíficas e cruzadas. Levando em consideração as amostras de soro do G4 e G5 contra a rqTSA-25 houve apenas uma reação inespecífica (1/19), enquanto a Tcra apresentou (15/42), dessa forma, levando em consideração o alto valor da especificidade, pode-se recomendar a utilização da rqTSA-25 como antígeno confirmatório do diagnóstico da cisticercose bovina.

Sabe-se que, mesmo com uma grande homologia entre as espécies de tênia, sempre haverá uma maior afinidade na interação antígeno-anticorpo na relação parasita-hospedeiro específico, por isso, tem-se buscado tecnologias modernas, como a produção de antígenos recombinantes, se aproximar ao máximo das condições que ocorrem naturalmente no animal durante os diferentes estádios de infecção. De acordo com Allepuz et al. 2012, o custo de implementação de uma ferramenta mais sensível para o diagnóstico da cisticercose bovina deve ser relacionado com os benefícios de uma redução riscos de infecção humana (teniose), impactando no potencial de transmissão da cisticercose bovina e beneficiando também o setor pecuário, pela redução das perdas econômicas.



(a)



(b)

Figura 5. Reatividade ao teste ELISA utilizando como antígeno a proteína rqtSA-25 (a) (Cut off =0,488) e *Taenia crassiceps* (b), antígeno heterólogo (Cut off = 0,359). G1- amostras de sangue de bovinos procedentes de uma propriedade sem histórico de cisticercose, que foram infectados experimentalmente; G2- amostras de animais naturalmente infectados, cujo diagnóstico da cisticercose foi realizado durante a inspeção post-mortem conduzida na rotina de matadouros-frigoríficos supervisionados pelo serviço oficial de inspeção; G3- amostras de bovinos negativos para cisticercose e outras doenças abatidos sob as mesmas condições dos animais do grupo 2; G4- amostras de soro bovino também negativos para a cisticercose e criados sob isolamento ambiental, em condições sanitárias controladas desde o nascimento, quanto ao controle da cisticercose; G5- amostras de bovinos negativos para a cisticercose, contudo apresentando outras doenças (tuberculose, hidatidose e fasciolose), diagnosticadas ao abate sob as mesmas condições dos animais do grupo 2.

Na avaliação da resposta imune, foram utilizadas amostras de soro de bovinos experimentalmente infectados por cisticercos, em diferentes períodos pós-infecção (p.i.) experimental, variando de 0 dias p.i. até 120 dias p.i. com intervalos de 30 dias. Nessa

análise, foi possível observar a mesma tendência da cinética de produção de anticorpos IgG para ambos os antígenos (Figura 6). As amostras utilizadas evidenciaram o pico de produção de anticorpos IgG no mesmo período (30 dias p.i.), e posteriormente seu declínio (60 dias p.i.), como vem ocorrendo normalmente em infecções causadas por cisticercos. Guimarães-Peixoto et al. (2015b), analisaram a cinética de produção de anticorpos (IgM, IgG total e IgG subclasses 1 e 2) em amostras de soro bovinos contra o antígeno Tcra, e relataram um resultado similar ao observado para a IgG no presente estudo.

Ao mostrar uma resposta imune similar na identificação da cinética de produção de anticorpos IgG, reforça-se a grande homologia entre os antígenos de Tcra e rqtSA-25, justificando a utilização de ambos no diagnóstico da cisticercose bovina, contudo, destacando o desempenho superior relatado na rqtSA-25, na discriminação entre amostras positivas e negativas.

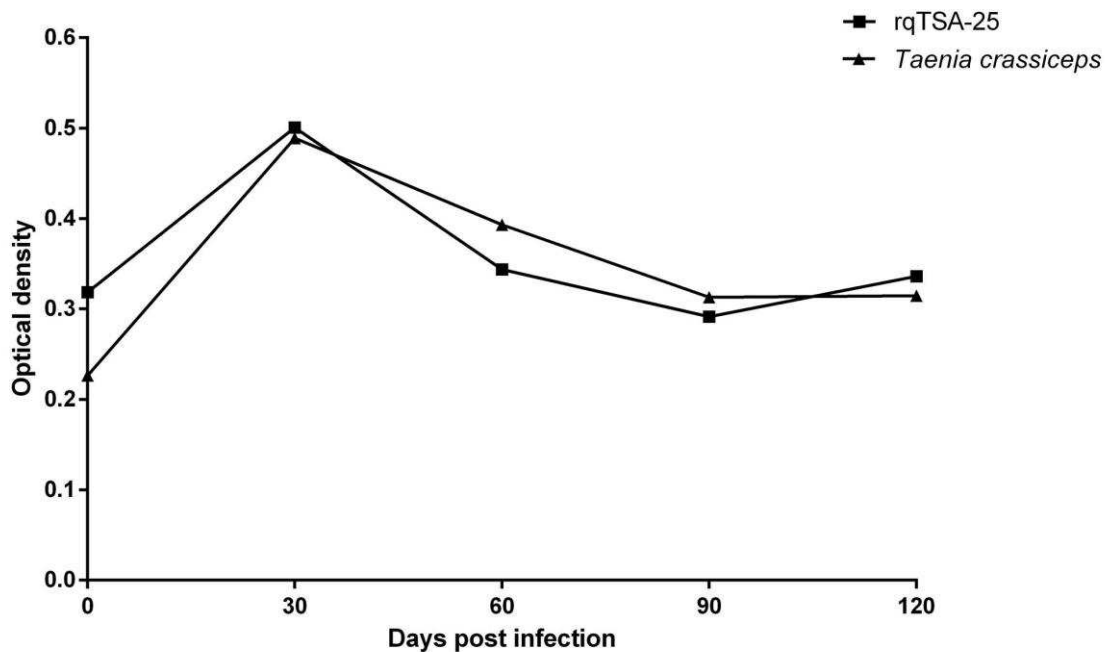


Figura 6. Evolução da resposta imune de sete bovinos infectados experimentalmente com ovos de *Taenia saginata*, utilizando o ELISA contra o antígeno de rqtSA-25 e *Taenia crassiceps*.

Para confirmação da eficácia da proteína rqtSA-25, algumas amostras de diferentes grupos de soro-controle foram submetidas ao imunoblot, relatado como um teste de diagnóstico confirmatório, pois normalmente, possui uma maior especificidade do que o teste ELISA. Dessa forma, foi possível constatar que não houve nenhuma reação falso positiva ou falso negativa durante a realização do teste (Figura 7).

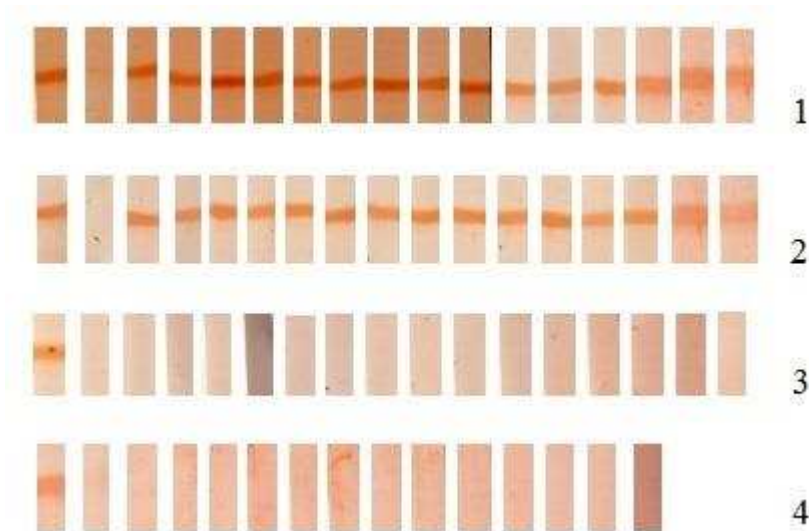


Figura 7. Amostra soro-controle positivas (primeira amostra de cada linha) e negativas (segunda amostra de cada linha), respectivamente, em cada grupo. Linha 1: Amostras de soro bovino experimentalmente infectadas; Linha 2, amostras de soro bovino naturalmente infectados; Linha 3, amostras de soro bovino negativos a cisticercose durante inspeção de rotina; Linha 4, amostras negativas a cisticercose bovina durante inspeção de rotina, mas que apresentaram outras patologias (tuberculose, fasciolose ou hidatidose).

Atualmente, estudos que relatam o uso de antígenos recombinantes para o diagnóstico da cisticercose bovina são escassos. A grande maioria das pesquisas mantem o foco no diagnóstico da *Taenia solium*, por ser causadora da cisticercose suína e humana, com maior impacto na saúde pública. Entretanto, levando em consideração a importância econômica e sanitária, além da maior ocorrência da cisticercose bovina e em diferentes regiões mundiais, torna-se importante divulgar e ampliar as pesquisas que possam aprimorar o diagnóstico e, conseqüentemente o controle da cisticercose bovina.

#### 4. CONCLUSÃO

Quando se explorou o novo antígeno rqTSA-25, as taxas de desempenho do teste ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina, se elevaram como um todo (Acurácia de 92%), compensando algumas deficiências deixadas por outros protocolos laboratoriais atualmente desenvolvidos (Acurácia de 81%), demonstrando também uma alta performance ao utilizar o imunoblot como teste confirmatório. Os testes se mostraram eficazes na diferenciação de amostras positivas e negativas, destacando seu alto poder discriminatório em infecções naturais, contribuindo com os testes complementares ao diagnóstico de rotina em estabelecimentos de abate ou pesquisas no setor pecuário.

## 5. REFERÊNCIAS

ABUSEIR, S. et al. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. **Parasitology Research**, v. 101, n. 1, p. 131–137, 2007.

ALLEPUZ, A. et al. Comparison of bovine cysticercosis prevalence detected by antigen ELISA and visual inspection in the North East of Spain. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 3, p. 393–395, 2012.

BEGHETTO, E. et al. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: Toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2133–2140, 1 jun. 2006.

BOARINO, A. et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 5, p. 647–53, maio 2005.

CLIQUET, F. et al. Development of harmonised schemes for monitoring and reporting of rabies in animals in the European Union. **Scientific report submitted to EFSA**. v. 34, n. 178, p. 7–8, 2010.

CHEN, J. et al. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. **Amino acids**, v. 33, n. 3, p. 423–8, set. 2007.

CHEN, X.; ZARO, J. L.; SHEN, W. C. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 10, p. 1357–1369, 2013.

DORNY, P.; PRAET, N. *Taenia saginata* in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 1-2, p. 22–24, 2007.

EICHENBERGER, R. M.; STEPHAN, R.; DEPLAZES, P. Increased sensitivity for the diagnosis of *Taenia saginata* cysticercus infection by additional heart examination compared to the EU-approved routine meat inspection. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 989–992, 2011.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual review of physiology**, v. 61, p. 243–82, 1999.

FERRER, E. et al. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 83–94, 2003.

FERRER, E. et al. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 517–525, 2007.

GAUCI, C. G. et al. *Taenia solium* and *Taenia ovis*: stage-specific expression of the vaccine antigen genes, TSOL18, TSOL16, and homologues, in oncospheres. **Experimental parasitology**, v. 113, n. 4, p. 272–5, ago. 2006.

GIROTTI, A. et al. Detecção de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina no immunoblot. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1147–1151, 2009.

GOFFARD, A. et al. Role of N-Linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Society**, v. 79, n. 13, p. 8400–8409, 2005.

GONZALEZ, L. M. et al. Molecular and functional characterization of a *Taenia* adhesion gene family (TAF) encoding potential protective antigens of *Taenia saginata* oncospheres. **Parasitology Research**, v. 100, n. 3, p. 519–28, fev. 2007.

GONZÁLEZ, L. M. et al. Genetic variability of the 18 kDa/HP6 protective antigen in *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*: Implications for vaccine development. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 176, n. 2, p. 131–134, 2011.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R. P. M. et al. Distribuição e identificação das regiões de risco para a cisticercose bovina no estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 975–979, 2012.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R. P. M. et al. Desempenho do ELISA no diagnóstico da cisticercose utilizando bovinos experimentalmente e naturalmente infectados com o metacésteo de *Taenia saginata*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 807–816, 2015a.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R. P. M. et al. Infecção experimental em bovinos: Cinética da produção de imunoglobulinas IgM e IgG contra cisticercose bovina e resposta inflamatória. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 787–796, 2015b.

HEVEY, M. et al. Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants. **Virology**, v. 239, n. 1, p. 206–16, 8 dez. 1997.

JABBAR, A. et al. Variation in the cellular localization of host-protective oncospherical antigens in *Taenia saginata* and *Taenia solium*. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 9-10, p. 684–695, 2010a.

JABBAR, A. et al. The ultrastructure of taeniid cestode oncospheres and localization of host-protective antigens. **Parasitology**, v. 137, n. 3, p. 521–35, mar. 2010b.

JABBAR, A. et al. Localisation of three host-protective oncospherical antigens of *Taenia ovis*. **International journal for parasitology**, v. 40, n. 5, p. 579–89, abr. 2010c.

JABBAR, A. et al. Oncospheral penetration glands and secretory blebs are the sources of *Taenia ovis* vaccine antigens. **Infection and immunity**, v. 78, n. 10, p. 4363–73, out. 2010d.

KOCH, M. et al. Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. **Virology**, v. 313, n. 2, p. 387–400, 2003.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome research**, v. 2, p. 2, 2006.

LEKKERKERKER, A. N. et al. Potency of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 antibodies to inhibit the interaction of DC-SIGN with HIV-1 gp120. **Virology**, v. 329, n. 2, p. 465–476, 2004.

LEVITT, M. Conformational preferences of amino acids in globular proteins. **Biochemistry**, v. 17, n. 20, p. 4277–4285, out. 1978.

LIGHTOWLERS, M. W.; ROLFE, R.; GAUCI, C. G. Taenia saginata: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 330–8, 1996.

MINOZZO, J. C. et al. Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra *Cysticercus bovis*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 857–864, 2004.

MONTEIRO, L. L.; 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*. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 260–263, 2006.

MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat-shock transcriptional response: cross talk between a family of heat-shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes Development**, v. 12, p. 3788–3796, 1998.

OGUNREMI, O.; BENJAMIN, J. Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1-2, p. 93–101, 2010.

OHUCHI, M. et al. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8377–84, nov. 1997a.

OHUCHI, R. et al. Oligosaccharides in the stem region maintain the influenza virus hemagglutinin in the metastable form required for fusion activity. **Journal of virology**, v. 71, n. 5, p. 3719–25, maio 1997b.

PARKER, J. M. R.; GUO, D.; HODGES, R. S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, v. 25, n. 19, p. 5425–5432, set. 1986.

PASSOS, L. M. **Immunological studies on bovine babesiosis with particular reference to Brazil using “in vitro” culture- derived antigens**. Center of Tropical Veterinary Medicine, 1993.

PINTO, P.S.A. et al. Elisa test for the diagnosis of cysticercosis in pigs using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 71–79, 2000.

PONOMARENKO, J. et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 514, 2008.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. BcePred: Prediction of continuous B-Cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. In: **Artificial Immune Systems**. p. 197–204.

SAKO, Y. et al. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4439–44, dez. 2000.

SILVA, L. F. et al. Relevant peptides of *Taenia crassiceps* for the diagnosis of bovine cysticercosis by immunoblot. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 891–898, 2015.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Pesquisa de anticorpos contra *Cysticercus bovis*, por teste ELISA em bovinos de abatedouro. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 2, p. 77–85, 2010.

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

VAN GENNIP, H. G. P. et al. Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein ERNS or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. **Vaccine**, v. 19, n. 4-5, p. 447–459, 2000.

VARGAS-PARADA, L.; SOLÍS, C. F.; LACLETTE, J. P. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). **Parasitology**, v. 122, n. 05, p. 583–588, 2001.

VAZ, A. J. et al. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 3, p. 354–357, 1997.

## **CAPÍTULO 2**

Artigo aceito para publicação na Revista Acta Tropica

**Evaluation of a synthetic peptide from the *Taenia saginata* 18kDa surface/secreted oncospherical adhesion protein for serological diagnosis of bovine cysticercosis**

## Evaluation of a synthetic peptide from the *Taenia saginata* 18kDa surface/secreted oncospherical adhesion protein for serological diagnosis of bovine cysticercosis

Rafaella Paola Meneguete dos Guimarães-Peixoto <sup>a,\*</sup>, Paulo Sérgio de Arruda Pinto<sup>a</sup>, Marcus Rebouças Santos<sup>b</sup>, Marcelo Depólo Polêto<sup>c</sup>, Letícia Ferreira da Silva<sup>a</sup>, Abelardo Silva Júnior<sup>b</sup>.

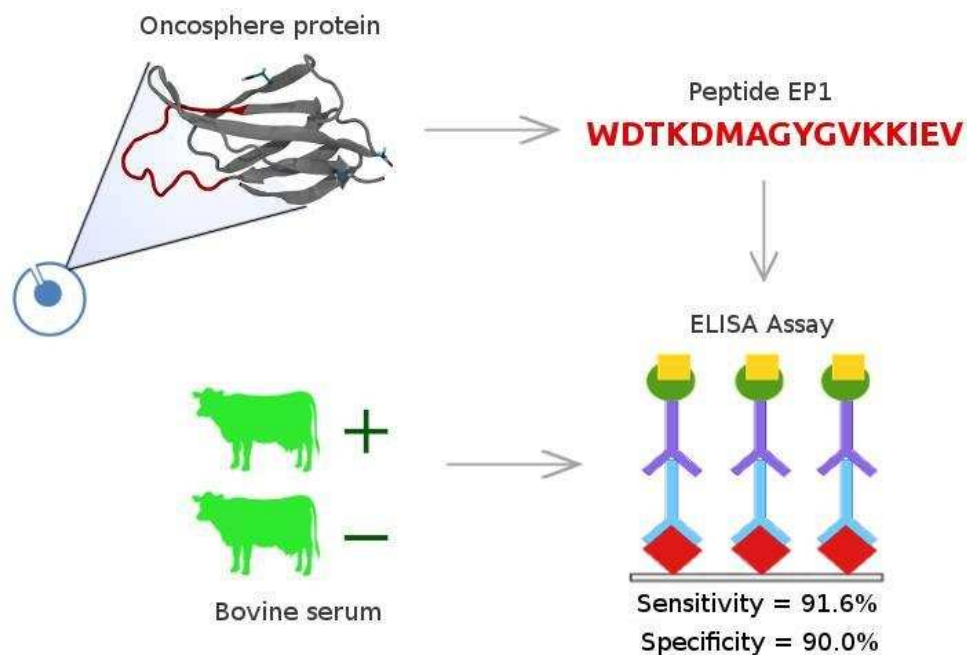
<sup>a</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Laboratório de Virologia Animal, Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 31 38991468

E-mail address: rafaella.peixoto@ufv.br (R.P.M. Guimarães-Peixoto).



## **Abstract**

Bovine cysticercosis is a zoonotic infection widely spread throughout Brazil, creating a burden on hygiene maintenance and the economy. Diagnosis of cysticercosis usually relies on post mortem inspection of carcasses in slaughterhouses. This detection method provides only low sensitivity. Recent advancements have improved the performance of serologic tests, such as ELISA, providing greater sensitivity and specificity. The objective of the current study was to identify and evaluate a synthetic peptide derived from the *Taenia saginata* 18kDa oncospheric surface protein for the diagnosis of bovine cysticercosis in ELISA. Test performance of the identified peptide was compared to an ELISA based on a heterologous crude *Taenia crassiceps* antigen (Tcra), widely used for the sero-diagnosis of bovine cysticercosis. Based on the primary sequence of an in silico structural model of the 18 kDa protein, an epitope region designated EP1 was selected (46-WDTKDMAGYGVKKIEV-61). The peptide derived from this region yielded 91.6% (CI=80-96%) sensitivity and 90% (CI=82-95%) specificity when used in an ELISA, whereas the crude antigen yielded 70% (CI=56-8%) sensitivity and 82% (CI=73-89%) specificity. Thus, we conclude that EP1 has higher diagnostic potential for detecting bovine cysticercosis than the crude antigen Tcra.

Key words: *Taenia saginata*; Bovine cysticercosis; ELISA; oncospheric protein; Synthetic peptides.

## 1. Introduction

Bovine cysticercosis is a parasitic infection. It's caused by the larval stage of the human intestinal parasite *Taenia saginata*. It is rather a food hygienic and economic problem than a health problem with severe impact, and is widely spread throughout Brazil, causing concern in meatpacking depots as well as among rural livestock producers. In Brazil, the reported average prevalence is 1.05%, which varies among Federal States (Dutra et al., 2012).

Usually, bovine cysticercosis is diagnosed during a routine post mortem examination of carcasses at official meat inspection in slaughterhouses. The examination consists of standard cuts through the muscle tissue for the detection of cysticerci (Brasil, 1971). However, some infected carcasses are missed during this procedure, as demonstrated by a probabilistic model developed by Kyvsgaard et al. (1990), which showed that over 85% of infected animals may be missed during routine meat inspection. The low sensitivity of routine post-mortem examination is reported by several authors (Dorny et al., 2000; Eichenberger et al., 2013; Guimarães-Peixoto et al., 2015), and with that comes new emerging alternatives for the diagnosis of cysticercosis, as an example, Eichenberger et al. (2011) that suggested the use of an auxiliary model by additional cuts in the muscle; Wanzala et al. (2003), recommend increasing the area and number of locations inspected; and currently, it has been employed the use of auxiliary serological tests such as ELISA identifying the disease in the animal with greater precision (Dorny et al., 2000; Pinto et al., 2006; Monteiro et al., 2008; Allepuz et al., 2012; Guimarães-Peixoto et al., 2015). It is noteworthy that, in a retrospective study of data from the Federal Inspection Service of Brazil, Souza et al. (2007) found that 94% of carcasses parasitized by cysticerci is monocysticercosis (only one cysticercus in routine inspection sites).

The *Taenia crassiceps* antigen has been used in ELISA assays for the diagnosis of cysticercosis since it features proteins homologous to those of *Taenia saginata*. Another advantage of using the *Taenia crassiceps* antigen is the ease of handling of cysticerci in the laboratory and that standardized reproducible results can be obtained using low-cost materials for immunological assays (Larralde et al., 1990). However, the accuracy of the test may be compromised by the lack of species specificity. Many researchers emphasize the need to implement serologic ELISA tests as auxiliary routine inspection methods. This would require further evaluation of various laboratory protocols in order to increase the

tests' accuracy and efficiency (Monteiro et al., 2006; Ogunremi and Benjamin, 2010; Eichenberger et al., 2011 Allepuz et al., 2012).

The indirect ELISA test is not yet reliable in the detection of bovine cysticercosis in naturally infected animals (Monteiro et al., 2006; Allepuz et al., 2012) or in chronic cases of the disease, due to low amount of circulating antibodies in bovine. Therefore, new technologies are being implemented and utilized, including molecular techniques, such as synthetic peptides and prediction of their production in heterologous expression systems, with the goal of improving the performance of the immunological test (Ferrer et al., 2003; Ferrer et al., 2007; Parkhouse et al., 2008).

In its larval form, *T. saginata* expresses proteins that mediate the adhesion of the parasite to host cells. These proteins present one or two fibronectin type-III domains, which confer adhesion ability (Gonzales et al., 2007). Among the binding proteins, the 18 kDa protein is characterized as an important adhesin (Bonay et al., 2002) and potential vaccine immunogen protecting from cysticercosis (Lightowlers et al., 1996). The 18 kDa oncosphere protein (HP6-TSAG) is a secretion / excretion antigen (Ferrer et al., 2007). The use of *Taenia saginata* protein HP6 has been reported for the diagnosis of both animal and human cysticercosis (Ferrer et al., 2003; Ferrer et al., 2007; Abuseir et al., 2007).

Antigen-specific antibodies may be captured from serum samples via the substitution of short, synthetic peptides in the place of the protein antigen epitopes (Andresen and Bier, 2009). Innovative computational approaches results in the prediction of acceptable to high-precision of mapping of antigenic epitopes, facilitating the selection of peptides used for immunodiagnosics (Zimic et al., 2011; Wang et al., 2014). Within this context, the aim of the present study was to characterize and evaluate the diagnostic potential of a synthetic peptide derived from the *T. saginata* 18kDa oncopsheric antigen in an ELISA for the detection of bovine cysticercosis.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Computational characterization**

Preliminary, assembly of structural models was performed for the *Taenia saginata* 18kDa protein using a sequence was obtained from GenBank (Access code ADO86979.1). The structural models were generated by I-TASSER (Yang et al., 2015) and Phyre2 servers (Kelley et al., 2015) and the two best results from each server were compared in this work.

Additionally, transmembrane regions of the proteins were predicted by using the TMHMM server (Krogh et al., 2001). Possible N- and O- glycosylation sites from the primary amino acid sequence were predicted by using the NetNGIyc 1.0 (Gupta et al., 2004) and NetOGIyc 4.0 (Steentoft et al., 2004) servers.

## 2.2. Selection and preparation of antigenic peptide

An epitope map was assembled based on the three-dimensional model predicted for 18 kDa protein and its primary structure. Four methods were utilized: Bepipred® (Larsen et al., 2006), which uses a combination of Parker's hydrophobicity scales (Parker et al., 1986), Levitt's secondary structure (Levitt, 1978), and the hidden Markov model; ABCpred®, which utilizes an artificial neural network (Saha and Ragnava, 2006); AAPpred®, which utilizes an amino acid pair antigenicity scale (Chen et al., 2007); and ELIPRO®, which predicts discontinuous epitopes (conformational) by analyzing regions accessible to solvents and flexibility in a 3D structure (Ponomarenko et al., 2008). Ultimately, the resulting data converged in epitope EP1 (46-WDTKDMAGYGVKKIEV-61), which was subsequently synthesized (Genscript®, USA) with >95% purity.

## 2.3 Serum samples

The samples of bovine serum used in our study constituted five distinct groups, as follows: Group 1 (G1, n=60) was composed of experimentally infected bovine blood samples, which were previously collected at different post-infection periods from an establishment without a history of cysticercosis. Nine male bovines, livestock of mixed Dutch-Zebu breeds, were inoculated with a parasitic load of 120,000 eggs of *Taenia saginata*. The tapeworm sample was previously obtained by a human donor, and tapeworm species was confirmed by direct microscopy. Cysticercosis was confirmed in all animals belonging to G1 at meat-inspection in a slaughterhouse. Group 2 (G2, n=60) consisted of samples from naturally infected animals whose cysticercosis diagnosis had been made during routine post-mortem surveillance conducted in slaughterhouses supervised by the official inspectional service. Group 3 (G3, n=60) constituted of samples from livestock slaughtered in commercial slaughterhouses that tested negative for cysticercosis and other diseases during routine post-mortem inspection. Lastly, Group 4 (G4, n=28) consisted of samples from livestock that tested negative for cysticercosis, but presented with other

diseases (tuberculosis (n=8), hydatidosis (n=8), and fasciolosis (n=12), to check possible cross-reaction with cysticercosis.

## 2.4. Indirect ELISA

### 2.4.1 Synthetic peptide-based ELISA

The optimal dilutions for the reagents used in the ELISA assays were determined via block titration. The immunoassay plates (Thermo. Nunc, Maxisorp) were initial treated with Polypep® 2% (Sigma P5163) for 10 hours at 25°C, followed by three washes with PBS, pH 7.4. The peptides were diluted with 0.5 M (1 µg/mL) carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.4, and incubated in the plates overnight at 4°C. After three washes (with 0.15 M saline solution, pH 7.4, containing 0.05% Tween 20), the plates were blocked (with 1% Molico® denatured powdered milk in PBS) and incubated for 1 hour at 37°C. The livestock serum samples were diluted 1:25 in the blocking solution with 0,05% Tween 20, for 1 hour at 37°C. Following three times washing, an rabbit anti-bovine IgG antibody conjugated to peroxidase (A5295, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) was added to the plates at a 1:1.250 dilution, followed by incubation and washing steps as described above. The spectrophotometric detection was initiated via incubation with a solution of 0.1% o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) and 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.2 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0, for 30 minutes 37°C. The reaction was stopped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4N), and the plates were read in a spectrophotometer (Biotek Instruments) at a 492 nm wavelength. All reagents were added to the plates at a volume of 100 µL/well, except the blocking solution, at 200 µL/well.

### 2.4.2. *Taenia crassiceps* Antigen-based ELISA

*Taenia crassiceps* larval antigens were obtained via intraperitoneal inoculation of BALB/c female mice, following the methodology according to Vaz et al. (1997).

After collection, the cysticerci were immediately frozen (-20°C). Posteriorly, the cysticerci were lyophilized at 25°C and after that, homogenizer and mixed with a 0.15 M saline solution, resulting in a final concentration of 6.5 to 10%. The diluted cysticerci were then homogenized on ice using a tissue homogenizer (Potter) and then centrifuged at 17.400g for 30 minutes at 4°C. A protease inhibitor (PMSF, Sigma Chemical Co, St. Louis,

MO, USA, P7626, 0.25 M – 10 µL/mL) was added to the supernatant and the antigen was stored (-20°C) until used.

The polystyrene plates were sensitized with diluted antigens (40 µg/mL) in a 0.5 M buffered solution of carbonate-bicarbonate, pH 9.6. The ELISA plate was coated for 1 hour at 37°C. After three washes in saline solution containing 0.05% Tween 20, the reactive sites were blocked (using 5% denatured milk in PBS, pH 7.4) for 1 hour at 37°C. After additional three washes, the samples were diluted in 1% denatured milk in PBS, pH 7.4. The plates were then incubated for 30 minutes at 37°C. After washing, peroxidase-conjugated anti-IgG antibody (A5295, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) (1:5.000) was added to each well, and the incubation and wash procedures were repeated. The chemiluminescent reaction was initiated using a solution of 0.1% o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) P8287 (Sigma Chemical Co.; St Louis, MO, USA) and 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.2 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0. After a 5-minute-incubation, the reaction was stopped using 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the plates were read in a spectrophotometer at a wavelength of 492 nm. All reagents applied to the plates were applied at a volume of 100 µL/well, with the exception of the 200 µL blocking solution.

## 2.5. Determination of test performance

The reactivity of the peptides was evaluated based on the results obtained from the ELISA tests. Each ELISA reaction was performed in triplicate and the mean optical densities (OD) were calculated. The OD values were normalized to a standard reference plate, and the correction factor was calculated according to Passos (1993). The cut-off point was selected based on the mean OD obtained from analyses of five negative serum-control samples collected from livestock raised in isolation, kept under controlled conditions and slaughtered under rigorous inspection, including two standard deviations.

To determine the performance of the ELISA test, were used serum-control groups distributed as follows: analysis of antibody kinetics (G1) to evaluate the diagnosis performance; to calculate the sensitivity (G2), specificity (G3-G4) considering all the negative samples for cysticercosis after inspection and potential cross-reactions. The tests' sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and accuracy were calculated based on the recommendations of Altman, Bland (1994) and Akobeng (2006). To test the performance rates it was taken into account a confidence interval of (CI) 95%.

## 2.6. Ethics committee approval

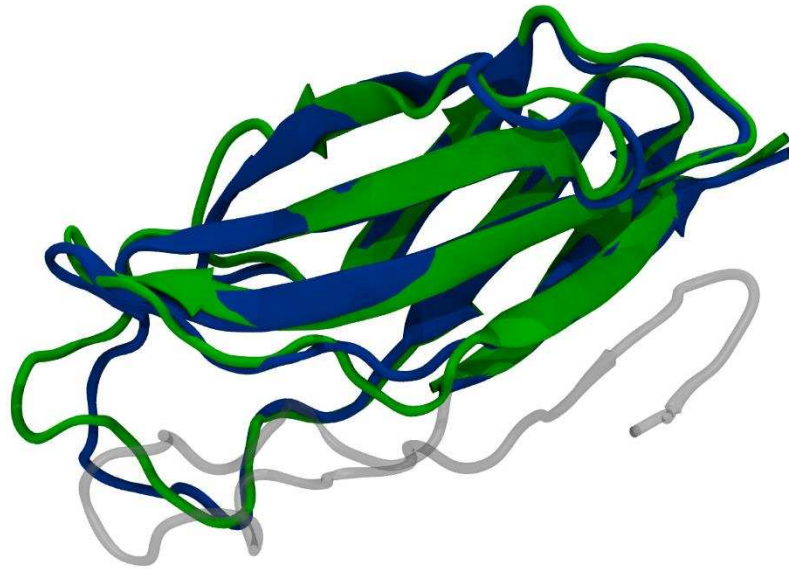
The norms of conduct for the use of animals in research from the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Viçosa were followed according to the Process reference 20/2011 CEUA/UFV.

## 3. RESULTS

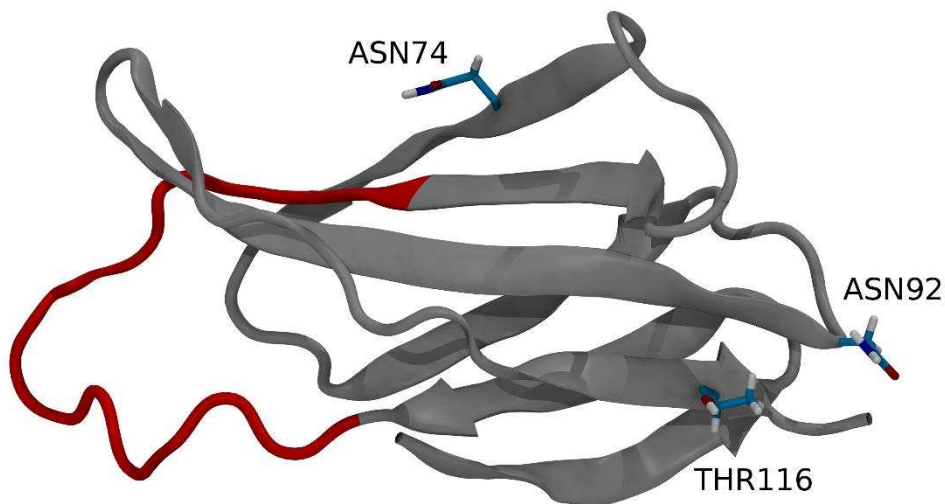
Structural models of 18 kDa protein were generated using I-TASSER and Phyre2 servers through comparative modeling, fold recognition and ab initio algorithms. Among the resulting models, the ones with higher scores from each server were selected for more in-depth comparisons. Interestingly, the structures with the highest scores were obtained for an protein model using a fibronectin type-III domain of human neural cell adhesion molecule (PDBID 2DOC), leading to C-score of -1.99 in I-TASSER and Confidence of 95.4% in Phyre2. Both models converged to a very similar fold, with a root mean square deviation (RMSD) value of 1.167 Å (Figure 1a). Due to the similarity between both models, all structural features of 18 kDa protein were discussed in this work using the 3D structure obtained by Phyre2.

Since 18 kDa protein is known to be a membrane protein (Bonay et al., 2002), further analyses were carried out using the TMHMM server in order to predict transmembrane helical regions. Despite the highly hydrophobic region 5-FGLILLVAVVLA-17, the server did not predict sequence as a transmembrane helix with high probability of occurrence (data not shown). However, region 1-17 was predicted to contain a signal peptide with a mean score of 94.4%, confirming the hypothesis of an N-terminal transmembrane region in 18 kDa protein. Therefore, the predicted N-terminal structure of 18 kDa was not taken into account in this study, due to the high probability that this region forms a transmembrane structure.

In addition, since 18 kDa protein is located in the outer membrane and it contains a signal peptide, it is possible that glycosilation pathways could be involved in maturation. Therefore, glycosilation sites predictions were performed using the NetNGlyc 1.0 and NetOGlyc 4.0 servers. Both servers predicted N-glycosylation sites at ASN74 and ASN92, and an O-glycosylation site at THR116 (Figure 1b), with scores of 0.7303, 0.5054 and 0.7021, respectively.



(a)



(b)

Figure 1. Three-dimensional model of the 18 kDa protein. (a) Overlapping of predicted models by I-TASSER (in blue) and Phyre2 (in green). In translucent silver, the N-terminal structure modeled by I-TASSER and not considered in this study. (b) Localization of the predicted epitope EP1 (in red). In blue, the putative sites of N-glycosylation (ASN74 and ASN92) and O-glycosylation (THR116).

The results of the bioinformatics programs used for epitope prediction of 18 kDa protein mostly converged in the region of amino acid of 46-WDTKDMAGYGVKKIEV-61. The peptide derived from this region was subsequently named EP1, being used for the posteriors analyses. EP1 in our model was exposed to a solvent in a beta-hairpin without any predicted sites of glycosylation (Figure 1b). The antibody discrimination by the

peptide and its diagnostic potential was measured by its performance in ELISA. The EP1 antigen was detected in most of the positive serum controls (n=112/120) (animals experimentally or naturally infected) (Figure 2), while the majority of negative animal serum samples (n=80/88) did not react with the EP1 peptide. Therefore, these results indicate that EP1 enabled distinction between positive and negative samples in the ELISA assay. The performance rates were calculated and were obtained the following results: 91.6% sensitivity (CI=80-96%), 90% specificity (CI=82-95%), 85% positive predictive value (PPV) (CI=75-93%), 93% negative predictive value (NPV) (CI=86-97%) and 91% accuracy.

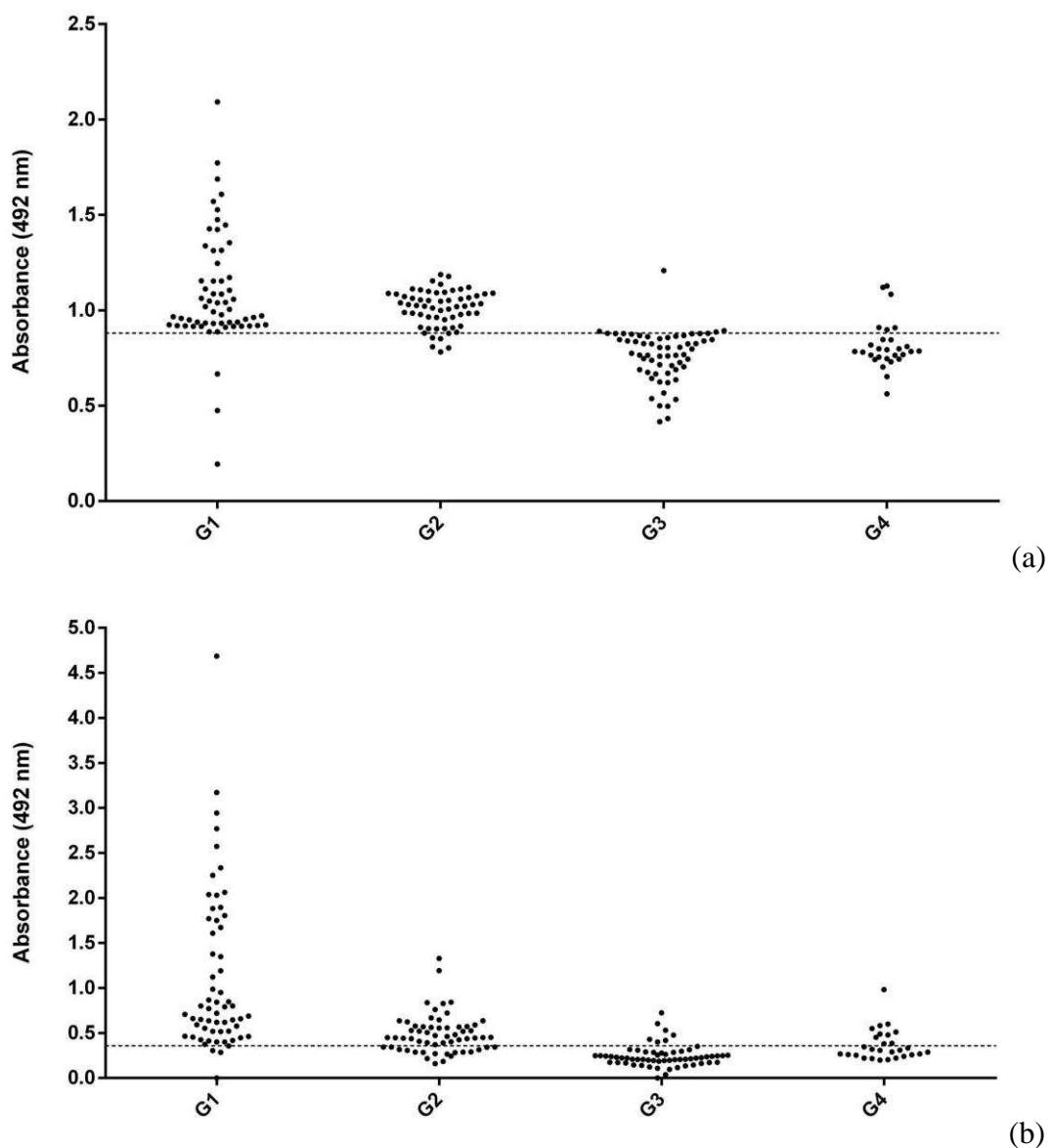


Figure 2. Reactivity of bovine serum samples in the ELISA test and cut-off (dotted line). Assays conducted using (a) EP1 peptide as an antigen (Cut off 0,881); (b) *Taenia crassiceps* heterologous antigen (Cut off 0,359).

#### 4. DISCUSSION

The major recent improvements in biomolecular modeling techniques have greatly improved the accuracy of theoretical structural models (Figueiredo et al., 2014). Based on this background, we generated structural models of *Taenia. saginata* 18kDa oncospheric protein, using computational approaches. Based on the fold recognition steps and ab initio calculations used for the creation of this model, the folding convergence and low RMSD indicate that our model is likely and accurate structural representation of 18 kDa protein. It is important to note that the final models were very similar to the one described by Kyngdon et al. (2006) for the *Taenia solium* TSOL18 protein, which has 61% identity with the *Taenia saginata* 18 kDa protein and analogous function. Furthermore, Lightowers et al. (2003) previously described a putative ASN74 glycosylation site in TSOL18, as was also predicted in our model, thus further increasing the confidence in our model.

With the aim of improving diagnostic tests against different pathogens, various studies have attempted to map B lymphocyte epitopes in a manner similar to that presented in this study (Meloan et al., 2003). The main technique used to identify conformational epitopes relies on a three dimensional structural representation of the protein of interest, as well as inferences regarding regions or amino acid residues that may interact with antibodies. Despite this attractive method, the majority of the studies describe linear and not conformational epitopes (Vita et al., 2010). The main explanation for this discrepancy is that various proteins present a challenge in plausible resolution of tertiary structure, because of either the high cost and time required for crystallography, or in computational molecular modeling. For our research, we employed four methods of epitope prediction, including one conformational epitope prediction method and the three linear prediction methods. It is important to emphasize that only linear epitopes were predicted, which were based on convergent regions predicted by the software programs and regions not described in other studies.

The immunodominant oncosphere antigens are considered immune targets and may also have preventive and diagnostic applications (Ferrer et al., 2003). The 18 kDa oncospheric protein is termed HP6 (Ferrer et al. 2003, 2007; González et al., 2011) or TSA-18 (Lightowers et al., 1996; Jabbar et al., 2010).

The following performance indicators were obtained from the ELISA test using the heterologous antigen (*T. crassiceps*): 70% sensitivity (CI= 56-80%), 82% specificity (CI=73-89%), 72% PPV (CI=60-84%), 80% NPV (CI=70-87%), and 78% accuracy. The

use of EP1 in an ELISA yielded slightly higher values than those from the heterologous antigen, indicating a improved performance of the diagnostic test. While EP1 was able to detect 91.6% of samples from the naturally infected animals, the *Taenia crassiceps* crude heterologous antigen only detected 70% of the samples. It is known that there is a homology between the 18 kDa protein of *Taenia saginata* and different species such as: *Taenia multiceps* – Tm18 (85.5%), *Taenia solium* – TSOL18 (61.5%), *Taenia ovis* – To18 (79.7%), *Taenia asiatica* TASI18 (95.5%) e *Taenia hydatigena*. A infecção em bovinos só ocorre com a *Taenia multiceps* (Avcioglu et al. 2011) e *Taenia hydatigena* (Dada and Belino, 1978), however, it is important to note that the serum control samples (G1, G2, G3, G4) are obtained from animals that have undergone post-mortem inspection and discard a possible co-infection with these parasites.

Ferrer et al. (2003) synthesized six peptides derived from *Taenia saginata* proteins, using the antigenic index of Jameson and Wolf (Jameson and Wolf, 1988). The two peptides (HP6-2 and HP6-3) derived from 18 kDa protein were able to differentiate serums from cysticercosis-positive and -negative animals in a smaller sample size. It is important to state, in contrast to EP1, which is located in a exposed beta-harpin, HP6-2 is mostly buried in our model, while HP6-3 is mainly located in the protein C-terminal region and, therefore, exposed to interactions (data not shown). This difference in location might reveal differences in the performance of diagnostic tests using the distinct peptides; a greater exposure of the peptide in the protein structure increases the probability of interaction with antibodies. Immunodominant peptides have a direct effect on disease, as evidenced by their high affinity for the host antibodies released during infection. Thus, a more thorough understanding of the biology of the immunodominant peptides will greatly aid the attempts to improve the performance of immunodiagnostic tests (Noya et al., 2003).

Thus, in comparison to using the heterogenic antigen, the use of the EP1 peptide may enable improved detection of cysticerci in naturally infected animals and/or in animals with monocysticercosis. Animals naturally infected have low amounts of circulating antigens, which normally hinder accurate diagnoses. According to Allepuz et al. (2012), the cost of implementing of a more sensitive tool for the diagnosis of bovine cysticercosis should be compared with the associated benefits for human health, given the great potential of limiting the transmission cycle of bovine cysticercosis. The use of an improved diagnostic tool for bovine cysticercosis would also benefit the livestock-farming sector by reducing economic loss.

The ELISA test has been used in research worldwide (Pinto et al., 2000; Ferrer et al., 2003; Ferrer et al., 2007; Monteiro et al., 2006; Allepuz et al., 2012; Guimarães-Peixoto et al., 2015). It should be noted that the ELISA should be able to detect animals at different stages of infection (viable or non-viable cysticerci), and similarly, showing satisfactory performance (Pinto et al., 2006; Monteiro et al., 2006; Minozzo et al., 2004; Guimarães-Peixoto et al. 2015). According Smith et al. (1991) low levels in low cyst-burden produced antibodies hinder the selection of a cutoff point and interpretation of findings in serological tests such as ELISA, especially in monocysticercosis (Thomaz-Soccol et al., 2010).

In the performance of an ELISA test, it is important to consider the amplitude value of the difference between the positive and negative control sera (Guimarães-Peixoto et al. 2015; Silva et al. 2015). Thus, the aim of this research was to set up a laboratory scenario using the optical density values adjusted to a standard plate to compare the performance of peptide EP1 with the antigen Tcra, thus the background are reduced.

## **5. CONCLUSION**

In the present study, a computational approach was used to select a peptide with great potential for use in serologic diagnosis of bovine cysticercosis. The selected EP1 peptide enabled discrimination between samples from animals positive or negative for cysticercosis. The EP1 peptide also exhibited improved performance compared to the heterologous antigen of *Taenia crassiceps*.

The increasing use of computational tools to obtain structural data of biomolecules has significantly improved our understanding of antigen-antibody interactions. In this study, the creation of a conformational model of 18 kDa protein provided a theoretical framework for a suitable and rational methodological design that enabled the identification of a new epitope with potential use in the diagnosis of bovine cysticercosis.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Fapemig (Research Support Foundation of Minas Gerais), CAPES (the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), and CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) for the given support and Viviane Assao for the graphical abstract.

## REFERENCES

- Abuseir S., Kuhne M., Schnieder T., Klein G., Epe C., 2007. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. *Parasitol. Res.* 101, 131-137.
- Allepuz, A., Gabriel, S., Dorny, P., Napp, S., Jansen, F., Vilar, M.J., Vives, L., Picart, L., Ortuno, A., Gutiérrez, J., Casal, J., 2012. Comparison of bovine cysticercosis prevalence detected by antigen ELISA and visual inspection in the North East of Spain. *Res. Vet. Sci.* 92(3), 393-395.
- Andresen, H., Bier, F.F., 2009. Peptide microarrays for serum antibody diagnostics. *Methods Mol. Biol.* 509, 123-134.
- Akobeng, A.K., 2006. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive Values. *Acta Paediatrica.* 96, 338-341.
- Avcioğlu, H., Yildirim, A., Duzlu, O., Inci, A., Terim, K.A., Kapakin, Balkaya, I. 2011. Prevalence and molecular characterization of bovine coenurosis from Eastern Anatolian region of Turkey. *Vet. Par.* 176 (1), 59-64.
- Bonay, P., Gonzalez, L.M., Benítez, L., Foster, M., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E., Gárate, T., 2002. Genomic and functional characterization of a secreted antigen of *Taenia saginata* oncospheres. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 269-273.
- Brasil., 1971. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Inspeção de carnes: padronização de técnicas, instalações e equipamentos. Brasília, DIPOA/DICAR. Tomo I: Bovinos. pp. 183.
- Chen, J., Liu, H., Yan, J., Chou, K., 2007. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids.* 33, 423-428.

Dada B.J., Belino, E.D. 1978. Prevalence of hydatidosis and cysticercosis in slaughtered livestock in Nigeria. *Vet. Rec.*103, 311-312.

Dutra, L.H., Giroto, A., Vieira, R.F.C., Vieira, T.S.W.J., Zangirolamo, A.F., Marquês, F.A.C., Headley, S.A., Vidotto, O., 2012. The prevalence and spatial epidemiology of cysticercosis in slaughtered cattle from Brazil. *Semin. Ciênc. Agrár.* 33(5), 1887-1896.

Dorny, P., Vercammen, F., Brandt, J., Vansteenkiste, W., Berkvens, D., 2000. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. *Vet. Parasitol.* 88, 43-49.

Dorny, P., Praet, N., 2007. *Taenia saginata* in Europe. 149, 22-24.

Eichenberger, R.M., Stephan, R., Deplazes, P., 2011. Increased sensitivity for the diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis infection by additional heart examination compared to the EU-approved routine meat inspection. *Food Control.* 22, 989-992.

Eichenberger, R.M., Lewis, F., Gabriel, S., Dorny, P., Torgerson, P.R., Deplazes, P., 2013. Multi-test analysis and model-based estimation of the prevalence of *Taenia saginata* cysticercosis infection in naturally infected dairy cows in the absence of a 'gold standard' reference test. 43, 853-859.

Ferrer, E., Benitez, L., Foster-Cuevas, M., Bryce, D., Wamae, L.W., Onyango-Abuje, J.A., Garate, T., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E., 2003. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 111, 83-94.

Ferrer, R., González, L.M., Martínez-Escribano, J.A., González-Barderas, M.A., Cortéz, M.M., Dávila, I., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E., Garate, T., 2007. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. *Parasitol. Res.* 101, 517-525.

Figueiredo, F.D., Antunes, D.A., Rigo, M.M., Mendes, F.A.M., Silva, J.P., Mayer, F.Q., Matte, U., Giugliane, R., Vieira, F.G., Sinigaglia, M., 2014. Lessons from molecular modeling human  $\alpha$ -L-iduronidase. *J. Mol. Graph. Model.* 54, 103-107.

Gonzalez, L.M., Bonay, P., Benitez, L., Ferrer, E., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E., Garate, T., 2007. Molecular and functional characterization of a *Taenia* adhesion gene family (TAF) encoding potential protective antigens of *Taenia saginata* oncospheres. *Parasitol. Res.* 100, 519-528.

Gonzalez, L.M., Ramiro, R., Garcia, L., Parkhouse, L.M., McManus D.P., Garate, T., 2011. Genetic variability of the 18 kDa/HP6 protective antigen in *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*: implications for vaccine development. *Mol. Biochem. Parasitol.* 176, 131-134.

Gupta, R., Jung, E., Brunak, S., 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation.

Guimarães-Peixoto, R.P.M., Pinto, P.S.A., Nero, L.A., Santos, T.O., Silva, L.F., Nieto, E.C.A., Rivetti Júnior, A.V., 2015. Performance of the ELISA test for the diagnosis of cysticercosis using experimentally and naturally cattle infected with metacestode of *Taenia saginata*. *Semin. Cienc. Agrar.* 36(2), 807-816.

Jabbar, A., Verastegui, M., Lackenby, A., Walduk, A. K., Gauci, C.G., Gilman, R.H., Lightowlers, M.W., 2010. Variation in the cellular localization of host-protective oncospherical antigens in *Taenia saginata* and *Taenia solium*. *Parasite Immunol.* 32, 684-695.

Jameson, B.A., Wolf, H., 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4, 181-186.

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10, 845-858.

Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305(3), 567-580.

Kyngdon, C.T., Gauci, C.G., Gonzalez, A.E., Flisser, A., Zoli, A., Read, A.J., Martinezocana, J., Strugnell, R.A., Lightowlers, M.W., 2006. Antibody responses and epitope specificities to the *Taenia solium* cysticercosis vaccines TSOL18 and TSOL45–1A. *Parasite Immunol.* 28, 191-199.

Kyvsgaard, N.C., Ilsoe, B., Henriksen, S.A., Nansen, P., 1990. Distribution of *Taenia saginata* cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance for routine meat inspection. *Res. Vet. Sci.* 49, 29-33.

Larralde, C., Sotelo, J., Montoya, R.M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Diaz, M.L., Sciutto, E., 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114, 926-928.

Larsen, J.E.P., Lund, O., Nielsen, M., 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* 2, 2.

Levitt, M., 1978. Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochemistry.* 17, 4277-4285.

Lightowlers, M.W., Rolfe, R., Gauci, C.G., 1996. *Taenia saginata*: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Exp. Parasitol.* 84, 330-338.

Lightowlers, M.W., Gauci, C.G., Chow, C., Drew, D.R., Gauci, S.M., Heath, D.D., Jackson, D.C., Dadley-Moore, D.L., Read, A.J., 2003. Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of Taeniid cestode parasites. *Int. J. Parasitol.* 33, 1207-1217.

Meloan, R.H., Puijk, W.C., Langeveld, J.P., Langedijk, J.P., Timmerman P., 2003. Design of synthetic peptides for diagnostics. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4(4), 253-260.

Minozzo, J.C., Thomaz-Soccol, V., Olortegui, C.C., Soares, V.E., Costa, A.J. 2004. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for immunodiagnostic of bovine

cysticercosis and kinetics of antibodies production against-Cysticercus bovis. Ciênc. Rural. 34(3), 857-864.

Monteiro, L.L.M., Pinto P.S.A., Araújo, J.V., Vaz, A.J., Silva, S.R., Silva, D.C.B., 2004. Emprego de antígenos de larva de Taenia crassiceps em teste ELISA para diagnóstico da cisticercose suína. Biosci J. Uberlândia. 20(1), 177-182.

Monteiro, L.L., Pinto P.S.A, Dias F.S., 2006. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with Cysticercus bovis. Vet. Parasitol. 141, 260-263

Noya, O., Pattaroyo, M.E, Guzman, F., Alarcon, B., Noya., D., 2003. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. Curr. Protein Pept. Sci. 4(4), 299-308.

Ogunremi, O., Benjamin, J., 2010. Development and field evaluation of a new serological test for Taenia saginata cysticercosis. Vet. Parasitol. 169, 93-101.

Parker, J.M., Guo, D., Hodges, R.S., 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites. Biochemistry. 25, 5425-5432.

Parkhouse, R.M.E., Bonay, P., González, L.M., Ferrer, E., Gárate, T., Aguilar, C.M., Cortez M.M., Harrison, L.J.S., 2008. TSOL18/HP6-Tsol, an immunogenic Taenia solium oncospherical adhesion protein and potential protective antigen. Parasitol. Res. 102, 921-926.

Pinto, P.S.A., Vaz, A.J., Germano, P.M.L., Nakamura, P.M., 2000. Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of Taenia solium and Taenia crassiceps cysticerci. Vet. Parasitol. 88, 127-130.

Pinto, P.S.A., Monteiro, L.L.M., Minozzo, J.C., 2006. Influence of different control-sela group in the bovine cysticercosis diagnosis employng the ELISA test. Rev. Ceres. 53, 574-579.

Passos, L.M.F., 1993. Immunological studies on bovine babesiosis with particular reference to Brazil using “in vitro” culture-derived antigens. PhD Thesis, Center of Tropical Veterinary Medicine, Edinburg. pp. 326.

Ponomarenko, J., Bui, H., Li, W., Fusseder, N., Bourne, P., Sette, A., Peters B., 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinform.* 9, 514.

Saha, S., Raghava, G.P.S., 2004. BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. *Artif. Immune Syst.* 3239, 197-204.

Silva, L.F., Pinto, P.S.A., Duarte, C.T.S., Santos, T.O., Nieto, E.C.A., Guimarães-Peixoto, R.P.M. 2015. Applicability of ELISA with different antigens to diagnose varying levels bovine cysticercosis. *Semin Cien. Agrar.* 36, 2013.

Smith, H. J., Snowdon, K., E.; Finlay, R. C., 1991. Serological diagnosis of cysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay in experimentally infected cattle. *Can J Vet Res.* 3, 274-276.

Souza, V.K., Pessoa-Silva, M.C., Kowalczyk, M., Marty, S., Thomaz-Soccol, V., 2007. Anatomic regions of major occurrence of *Cysticercus bovis* in bovines under federal inspection at slaughterhouse in the municipality of São José dos Pinhais, State of Paraná from July to December, 2000. *Brazil. J. Vet. Parasitol.* 16. 92-96.

Steentoft, C., Vakhrushey, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N.B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Bennett, E.T., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H.H., Levery, S.B., Clausen, H., 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 32(10), 1478-1488.

Thomaz-Soccol, V., Souza, V.K., Pessoa, O.L., Minozzo, J.C., Pessoa-Silva, M.C., Peixoto, R.P.M.G., Moura, J.F., 2010. Pesquisa de anticorpos contra *Cysticercus bovis*, por teste ELISA em bovinos de abatedouro. *Arch Vet Sci*, 15(2), 77-85.

Vaz, A.J., Nunes, C.M., Piazza, R.M.F., Livramento, J.A., Silva, M.V., Nakamura, P.M., Ferreira, W., 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57(3), 354-357.

Vita, R., Zarebski, L., Greenbaum, J.A., Emami, H., Hoof, I., Salimi, N., Damle, R., Sette, A., Peters, B., 2010. The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res.* 38, 854-862.

Wang, Y., Wang, G., Ou, J., Yin, H., Zhang, D., 2014. Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4. *Parasit Vectors.* 7, 474.

Wanzala, W., Onyango-Abuje, A., Kang'ethe, E.K., Zessin, K.H., Kyule, N.M., Baumann, M.P., Ochanda, H., Harrison, L.J., 2003. Control of *Taenia saginata* by post-mortem examination of carcasses. *African Health Sci.* 3, 68-76.

WHO/FAO/OIE., 2005. Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis. pp. 156.

Zimic, M., Gutierrez, A.H., Gilman, R.H., Lopez, C., Quiliano, M., Evangelista, W., Gonzales, A., García, H.H., Sheen, P., 2011. Immunoinformatics prediction of linear epitopes from *Taenia solium* TSOL18. *Bioinformatics.* 6, 271-274.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods.* 12, 7-8.

## CONCLUSÃO GERAL

Diante dos resultados obtidos, foi possível constatar o potencial diagnóstico de oito peptídeos obtidos de três regiões distintas da *Taenia saginata* preditos por programas de bioinformática. A partir de teste preliminar com todos os peptídeos e levando em consideração o referido desempenho, foi construída uma nova proteína recombinante quimera, que se mostrou altamente eficaz na diferenciação de amostras positivas e negativas para a cisticercose bovina, utilizando o ELISA e Immunoblot, aumentando significativamente o desempenho dos referidos testes em comparação ao antígeno de *Taenia crassiceps*. Levando em consideração o ineditismo da proteína rQTSA-25, bem como seu desempenho altamente satisfatório, evidencia-se um novo aliado na melhoria dos testes sorológicos para a detecção da cisticercose bovina.

## **ANEXOS**

Tabela 1. Resultado da densidade optica obtida pelo teste ELISA, em diferentes grupos de soro controle (++) amostras experimentalmente infectados, (+) amostras naturalmente infectadas, (-) amostras negativas a cisticercose durante inspeção de rotina, (op) animais negativos para a cisticercose contudo apresentando outras patologias tais como tuberculose, fasciolose ou hidatidose, (is) animais negativos a cisticercose e mantidos sob condições de isolamento, ao analisar: EP1, cutoff =0,881, EP3, cutoff =1,168, EP4, cutoff= 0,846, EP5, cutoff= 0,569, EP6, cutoff=0,599, EP7, cutoff= 0,631, EP8, cutoff= 0,525, (h) rqtSA-25, cutoff= 0,488.

EP1

Amostra	(++)	(+)	(-)	(op)	(is)
1	1,087	1,063	0,538	1,121	0,684
2	1,154	1,076	0,727	0,909	0,568
3	1,424	1,108	0,498	1,128	0,595
4	1,246	1,093	0,621	0,847	0,585
5	0,950	1,030	0,417	0,846	0,718
6	0,888	1,048	0,567	0,787	0,718
7	1,448	1,090	0,433	0,899	0,523
8	1,112	0,978	0,670	1,084	0,641
9	1,527	1,100	0,500	0,768	0,585
10	1,355	0,978	0,625	0,731	0,492
11	1,688	1,072	0,739	0,819	0,486
12	0,921	1,007	0,533	0,799	0,616
13	1,773	1,089	0,637	0,745	
14	2,093	0,965	0,705	0,747	
15	1,313	0,917	0,667	0,653	
16	1,608	1,030	0,760	0,742	
17	1,571	0,904	0,761	0,784	
18	1,338	0,984	0,868	0,794	
19	1,476	1,188	0,840	0,755	
20	1,427	0,963	0,806	0,811	
21	1,172	1,086	0,644	0,910	
22	1,042	1,155	0,765	0,785	
23	1,315	1,012	0,847	0,766	
24	0,920	0,951	0,689	0,703	

25	0,937	1,178	0,766	0,765
26	0,993	1,000	0,798	0,781
27	0,967	0,964	0,862	0,799
28	1,155	0,886	0,825	0,562
29	1,086	0,986	0,768	
30	1,063	0,909	0,711	
31	0,938	0,911	0,894	
32	0,939	0,880	0,715	
33	0,954	0,986	0,887	
34	0,934	1,035	0,775	
35	0,963	1,025	0,836	
36	0,932	1,113	0,764	
37	0,933	0,856	0,807	
38	0,977	1,022	0,745	
39	1,049	1,052	0,689	
40	0,667	0,989	0,675	
41	0,476	1,040	0,880	
42	0,924	1,020	1,209	
43	1,040	1,087	0,857	
44	0,959	1,095	0,851	
45	1,005	1,051	0,805	
46	0,195	1,121	0,877	
47	0,888	1,067	0,826	
48	0,924	1,137	0,890	
49	1,154	0,881	0,879	
50	0,919	1,106	0,868	
51	0,911	1,111	0,826	
52	0,972	1,022	0,880	
53	1,020	1,055	0,847	
54	0,916	0,809	0,864	
55	0,917	0,851	0,840	
56	1,059	0,782	0,747	
57	1,105	0,903	0,879	

Continuação

Amostra	(++)	(+)	(-)	(op)	(is)
58	0,916	0,803	0,824		
59	0,918	1,060	0,879		
60	0,916	0,904	0,875		

## EP3

Amostra	(++)	(+)	(-)	(op)	(is)
1	1,239	1,233	0,935	2,504	1,857
2	1,541	0,870	1,249	1,323	1,055
3	2,170	1,029	0,727	1,376	0,988
4	2,004	1,345	0,542	1,252	0,867
5	1,789	0,936	0,464	1,453	1,008
6	0,732	1,505	0,550	0,773	1,735
7	0,760	1,797	0,163	0,843	1,175
8	2,094	2,105	0,701	1,620	
9	0,665	1,943	0,918	1,461	
10	1,228	1,129	0,908	1,425	
11	1,185	1,731	0,354	1,565	
12	0,921	0,967	0,611	1,553	
13	1,024	1,640	1,080	0,668	
14	0,889	1,866	1,100	0,808	
15	2,102	1,150	0,248	0,851	
16	1,482	0,997	0,623		
17	0,866	1,265	0,462		
18	1,011	0,775	0,787		
19	0,892	0,526	0,964		
20	1,026	1,627	0,825		
21	0,988	1,268	1,289		
22	1,078	2,041	0,308		
23	1,736	2,262	0,546		
24	1,059	1,260	2,096		
25	0,988	1,613	1,476		
26	1,934	1,728	2,122		
27	1,021	1,329	1,652		
28	1,167	1,807	1,094		
29	2,445	1,587	1,176		
30	1,622	1,260	0,973		

## EP4

Amostra	(++)	(+)	(-)	(op)	(is)
1	0,920	0,920	0,609	1,930	1,120
2	1,122	1,122	0,796	0,653	0,813
3	1,604	1,604	0,571	0,918	0,531
4	1,305	1,305	0,476	1,043	0,536
5	1,067	1,067	0,469	0,763	0,652
6	0,443	0,443	0,451	0,355	1,147
7	0,476	0,476	0,197	0,632	0,918
8	0,377	0,377	0,574	1,099	
9	1,867	1,867	0,775	0,687	
10	0,783	0,783	0,806	0,844	
11	1,706	1,706	0,348	1,077	
12	0,886	0,886	0,547	1,223	
13	0,735	0,735	0,808	0,377	
14	1,102	1,102	0,637	0,366	
15	2,482	2,482	0,160	0,607	
16	1,157	1,157	0,713		
17	0,559	0,559	0,506		
18	0,830	0,830	0,609		
19	0,890	0,890	0,580		
20	0,865	0,865	0,744		
21	0,753	0,753	0,867		
22	0,749	0,749	0,526		
23	1,577	1,577	0,340		
24	1,090	0,866	1,272		
25	0,678	1,434	0,807		
26	1,648	1,226	1,383		
27	0,735	1,093	1,078		
28	1,021	1,749	1,432		
29	0,932	1,109	1,237		
30	0,696	0,866	1,589		

## EP5

Amostra	(++)	(+)	(-)	(op)	(is)
1	0,484	0,790	0,555	0,990	0,812
2	0,577	0,386	0,875	0,672	0,419
3	0,935	1,040	0,487	0,551	0,471
4	0,478	0,549	0,264	0,636	0,634
5	0,383	0,520	0,714	0,647	0,505
6	0,265	0,744	0,289	0,422	0,587
7	0,356	0,539	0,301	0,413	0,653
8	1,220	0,501	0,340	0,813	
9	0,217	0,668	0,415	0,595	
10	0,592	0,481	0,533	0,675	
11	0,750	0,748	0,284	0,593	
12	0,596	0,395	0,713	0,667	
13	0,408	0,757	0,839	0,606	
14	0,508	1,092	0,562	0,523	
15	1,485	0,703	0,334	0,435	
16	0,841	0,334	0,413		
17	0,562	0,705	0,557		
18	0,661	0,652	0,665		
19	0,504	0,537	0,546		
20	0,489	0,675	0,450		
21	0,634	0,652	0,513		
22	0,636	0,607	0,238		
23	1,140	0,745	0,514		
24	0,616	0,932	0,860		
25	0,537	0,508	0,620		
26	1,181	0,738	0,931		
27	0,791	0,735	1,279		
28	0,622	0,597	0,889		
29	0,563	0,688	0,443		
30	0,695	0,721	0,449		

## EP6

Amostra	(++)	(+)	(-)	(op)	(is)
1	0,774	1,151	0,607	1,337	0,973
2	1,019	0,694	0,906	0,701	0,578
3	1,141	0,869	0,447	0,745	0,580
4	0,519	0,762	0,500	0,790	0,709
5	0,874	0,726	0,471	0,695	0,585
6	1,341	0,985	0,250	0,218	0,826
7	0,200	0,949	0,195	0,359	0,470
8	2,211	0,855	0,366	0,954	
9	1,109	1,087	0,547	0,727	
10	1,104	0,541	0,677	0,604	
11	1,740	0,887	0,297	0,759	
12	0,563	0,433	0,654	0,664	
13	0,776	1,156	0,716	0,378	
14	1,081	1,276	0,897	0,257	
15	3,847	0,826	0,424	0,279	
16	1,345	0,326	0,419		
17	0,842	0,864	0,552		
18	0,850	0,741	0,534		
19	0,606	0,454	0,757		
20	0,450	0,736	0,615		
21	0,895	0,804	0,737		
22	0,805	0,678	0,342		
23	1,480	0,975	0,583		
24	0,550	1,561	1,231		
25	0,726	0,549	0,800		
26	1,688	0,824	0,989		
27	0,592	0,670	1,367		
28	0,791	0,953	1,055		
29	0,661	0,917	0,893		
30	0,756	0,881	0,508		

## EP7

Amostra	(++)	(+)	(-)	(op)	(is)
1	0,377	0,982	0,479	1,289	0,939
2	0,937	0,657	0,996	0,529	0,343
3	1,873	0,737	0,509	0,340	0,382
4	1,133	0,571	0,571	0,712	0,499
5	0,572	0,723	0,609	0,433	0,421
6	1,268	0,998	0,496	0,059	0,400
7	-0,270	0,746	0,408	0,188	0,363
8	2,417	1,062	0,553	0,661	
9	0,583	1,081	0,556	0,473	
10	0,761	0,737	0,816	0,431	
11	1,371	0,715	0,495	0,332	
12	0,352	0,438	0,546	0,731	
13	-0,019	0,969	0,721	0,207	
14	0,494	2,049	1,135	0,122	
15	4,112	0,601	0,746	0,076	
16	0,801	0,340	0,584		
17	0,674	0,789	0,629		
18	0,632	0,680	0,690		
19	0,349	0,333	0,847		
20	0,131	0,633	0,636		
21	1,126	0,861	0,801		
22	0,714	0,635	0,353		
23	1,414	0,949	0,582		
24	0,308	1,778	1,242		
25	0,580	0,529	0,641		
26	2,011	0,961	1,031		
27	0,314	0,695	1,363		
28	0,263	0,675	0,936		
29	0,978	1,228	1,317		
30	0,978	0,888	0,597		

## EP8

Amostra	(++)	(+)	(-)	(op)	(is)
1	0,630	0,686	0,675	1,053	0,786
2	1,520	0,357	0,356	0,561	0,522
3	1,635	0,474	0,684	0,555	0,448
4	0,916	0,357	0,350	0,590	0,414
5	0,609	0,552	0,359	0,431	0,571
6	1,913	0,824	0,293	0,241	0,578
7	0,196	0,426	0,236	0,299	0,317
8	1,821	0,738	0,294	0,670	
9	0,624	0,869	0,076	0,427	
10	1,012	0,131	0,035	0,522	
11	1,057	0,241	0,014	0,491	
12	0,653	0,063	0,031	0,484	
13	0,453	0,909	0,605	0,225	
14	0,916	1,044	0,586	0,228	
15	3,083	0,099	0,327	0,171	
16	0,915	-0,165	0,208		
17	0,550	0,502	0,352		
18	1,106	-0,004	0,299		
19	0,430	-0,193	0,423		
20	0,342	-0,123	0,409		
21	0,823	0,243	0,571		
22	0,829	0,034	0,051		
23	1,359	-0,047	0,279		
24	0,435	-0,024	0,164		
25	0,750	0,557	0,180		
26	2,376	0,684	0,255		
27	0,507	0,686	0,102		
28	0,492	0,595	0,268		
29	0,496	1,006	0,699		
30	0,485	0,667	0,255		

## rqTSA-25

Amostra	(++)	(+)	(-)	(op)	(is)
1	0,679	0,488	0,212	0,203	0,469
2	0,626	0,683	0,368	0,149	0,271
3	0,525	0,912	0,346	0,189	0,210
4	0,390	0,462	0,323	0,742	0,288
5	0,438	0,688	0,313	0,162	0,469
6	0,732	0,670	0,476	0,193	0,286
7	0,534	1,033	0,467	0,469	
8	0,488	0,787	0,385	0,423	
9	0,533	0,729	0,271	0,166	
10	1,240	0,585	0,152	0,201	
11	0,910	0,780	0,291	0,175	
12	0,342	0,626	0,267	0,405	
13	0,640	0,643	0,301	0,160	
14	0,582	0,527	0,190		
15	0,570	0,476	0,464		
16	0,458	0,805	0,390		
17	1,135	0,669	0,184		
18	0,602	0,964	0,206		
19	0,553	0,513	0,353		
20	0,988	0,680	0,493		
21	0,540	1,240	0,263		
22	0,608	0,747	0,306		
23	0,395	0,505	0,338		
24	0,529	0,904	0,433		
25	0,570	1,106	0,302		
26	0,646	0,830	0,236		
27	1,057	0,757	0,259		
28	0,508	1,339	0,445		
29	0,621	0,444	0,264		
30	0,409	0,495	0,194		



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

---

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA)/UFV certifica que o processo n.º 20/2011, intitulado “Interface da caracterização morfológica de lesões de larvas de *Taenia saginata* com o diagnóstico da cisticercose bovina” coordenado pela Professor Paulo Sérgio de Arruda Pinto, do Departamento de Veterinária, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 27/10/2011.

## CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 20/2011, named “*Interface of morphological characterization of Taenia saginata larval lesions with the bovine cysticercosis diagnosis*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on October 27, 2011 approved this process.

Viçosa, 27 de outubro de 2011.

Professor Cláudio César Fonseca  
Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV  
Coordenador