

LETÍCIA FERREIRA DA SILVA

**DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA CISTICERCOSE BOVINA UTILIZANDO
ANTÍGENOS DE *Taenia crassiceps*: AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS
LABORATORIAIS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586d
2013

Silva, Letícia Ferreira da, 1988-

Diagnóstico imunológico da cisticercose bovina utilizando antígenos de *Taenia crassiceps*: avaliação de protocolos laboratoriais / Letícia Ferreira da Silva. – Viçosa, MG, 2013. xiii, 92 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bovino. 2. Cisticercose. 3. *Taenia saginata*. 4. Soro diagnóstico. 5. Teste imunoenzimático. 6. *Taenia crassiceps*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20896964

LETÍCIA FERREIRA DA SILVA

**DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA CISTICERCOSE BOVINA UTILIZANDO
ANTÍGENOS DE *Taenia crassiceps*: AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS
LABORATORIAIS**

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

APROVADA: 07 de março de 2013.


Luiz Guilherme Dias Heneine


Antônio Augusto Mendes Maia


Paulo Sérgio de Arruda Pinto
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida e por tudo o que conquistei.

Aos meus pais, Antonio Alberto e Tereza, meus grandes exemplos, pela torcida, apoio e incentivo durante toda esta etapa.

Ao meu orientador, Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto, pela confiança em mim depositada, por sua disponibilidade, paciência e por todo o conhecimento repassado, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo pelas sugestões durante a realização deste projeto e por ter me cedido material de trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal por tornarem agradáveis e divertidos os muitos dias de laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários, Leandro e Adriana, que compartilharam tanto dos momentos de dificuldade quanto dos bons momentos.

À Tatiane, pelo auxílio nas análises estatísticas, e à Hanna, pela ajuda na análise do gel.

À Camilla por ter me ajudado durante toda a realização deste trabalho e também pelo grande apoio e amizade.

Ao Diego, pelo companheirismo e pelas palavras de incentivo, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Departamento de Veterinária e aos seus funcionários, principalmente ao Dagoberto, Luiz Carlos, Marquinho, Rosi e Beth pelo carinho e gentileza sempre que precisei de qualquer ajuda.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realizar o Mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Aspectos biológicos da <i>Taenia saginata</i>	3
2.2. Características epidemiológicas do complexo teníase-cisticercose bovino.. ..	4
2.2.1. Ciclo evolutivo da <i>Taenia saginata</i>	4
2.2.2. Fatores de risco para a ocorrência do complexo teníase-cisticercose bovino... ..	5
2.2.3. Prevalência da cisticercose bovina	6
2.3. Importância econômica da cisticercose bovina.....	8
2.4. Diagnóstico e controle da cisticercose bovina.....	9
2.5. Diagnóstico imunológico da cisticercose bovina	10
2.5.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	11
2.5.2. Immunoblot	13
2.5.3. Antígenos empregados no imunodiagnóstico da cisticercose bovina ..	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo geral	26
4.2. Objetivos específicos	26
CAPÍTULO 1	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1. Antígenos.....	29
2.1.1. Antígeno total (T)	30
2.1.2. Antígeno total sonificado (Ts)	30
2.1.3. Antígeno total dialisado (Td)	30
2.1.4. Antígeno de membrana (M)	30

2.1.5.	Antígeno de líquido vesicular (LV)	31
2.1.6.	Antígeno de líquido vesicular sonicado (LVs)	31
2.1.7.	Dosagem de proteína	31
2.1.8.	Caracterização dos antígenos (SDS-PAGE)	31
2.2.	Soros-controle	32
2.3.	Padronização do ELISA	32
2.4.	Análise dos resultados	33
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1.	SDS-PAGE.....	34
3.2.	Padronização do ELISA	37
3.2.1.	Concentração de antígenos e diluição de soros	37
3.2.2.	Diluição de conjugado.....	43
3.2.3.	Substância bloqueadora	48
3.2.4.	Comparação da eficiência entre os antígenos	50
4.	CONCLUSÃO	52
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CAPÍTULO 2		58
RESUMO		58
ABSTRACT		58
1.	INTRODUÇÃO	59
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1.	Antígenos.....	60
2.1.1.	Antígeno total de larva de <i>Taenia crassiceps</i> (T).....	61
2.1.2.	Antígeno total sonicado de larva de <i>Taenia crassiceps</i> (Ts).....	61
2.1.3.	Antígeno de membrana de larva de <i>Taenia crassiceps</i> (M).....	61
2.2.	Amostras de soros	61
2.3.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	62
2.4.	Análise dos resultados	63
2.4.1.	Correção das placas	63
2.4.2.	Cálculo do ponto de corte e das taxas de desempenho do teste.....	63
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.	CONCLUSÃO	69
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CAPÍTULO 3		73

RESUMO	73
ABSTRACT	73
1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1. Antígeno.....	75
2.2. Amostras	76
2.3. Padronização das diluições dos soros e conjugado.....	76
2.4. Immunoblot	76
2.5. Análise dos resultados	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1. Diluições dos soros e conjugado.....	78
3.2. Immunoblot	78
4. CONCLUSÃO	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
CONCLUSÃO GERAL	91

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Segmentos do estróbilo da *Taenia saginata*: *a*, escólex; *b*, colo; *c*, proglotes jovens; *d*, proglotes maduras; *e*, proglotes grávidas (Fonte: Rey, 2008).....3
- Figura 2. Ciclo evolutivo da *Taenia saginata* (Fonte: Adaptado de Delpy et al., 2005).....5

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Perfil dos peptídeos dos antígenos total (T), total sonicado (Ts), total dialisado (Td), membrana (M), líquido vesicular (LV) e líquido vesicular sonicado (LVs) de larva de *Taenia crassiceps*, acompanhados do marcador de massa molecular (MM).....34

CAPÍTULO 3

- Figura 1. Padrões de bandas reativas nas diferentes categorias de soros utilizadas nos ensaios de immunoblot: *MM*, marcador de massa molecular; *a*, positivos experimentais; *b*, positivos naturais; *c*, negativos para a cisticercose bovina; *d*, hidatidose; *e*, fasciolose; *f*, tuberculose.....85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Caracterização dos antígenos total (T), total sonicado (Ts), total dialisado (Td), membrana (M), líquido vesicular (LV) e líquido vesicular sonicado (LVs) de <i>Taenia crassiceps</i> de acordo com os peptídeos separados por SDS-PAGE.	36
Tabela 2. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno total (T) de <i>Taenia crassiceps</i>	38
Tabela 3. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno total sonicado (Ts) de <i>Taenia crassiceps</i>	39
Tabela 4. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno total dialisado (Td) de <i>Taenia crassiceps</i>	40
Tabela 5. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno de membrana (M) de <i>Taenia crassiceps</i>	41
Tabela 6. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno de líquido vesicular (LV) de <i>Taenia crassiceps</i>	42
Tabela 7. Médias das diferenças das das amplitudes densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno de líquido vesicular sonicado (LVs) de <i>Taenia crassiceps</i>	43

Tabela 8. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno total (T) de <i>Taenia crassiceps</i>	44
Tabela 9. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno total sonicado (Ts) de <i>Taenia crassiceps</i>	45
Tabela 10. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno total dialisado (Td) de <i>Taenia crassiceps</i>	46
Tabela 11. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno de membrana (M) de <i>Taenia crassiceps</i>	46
Tabela 12. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno de líquido vesicular (LV) de <i>Taenia crassiceps</i>	47
Tabela 13. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno de líquido vesicular sonicado (LVs) de <i>Taenia crassiceps</i>	48
Tabela 14. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com diferentes substâncias bloqueadoras e diluições dos soros para o antígeno total (T), total sonicado (Ts), total dialisado (Td), membrana (M), líquido vesicular (LV) e líquido vesicular sonicado (LVs) de <i>Taenia crassiceps</i>	50
Tabela 15. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com os diferentes antígenos de <i>Taenia crassiceps</i> (em suas melhores condições previamente definidas) e diluições dos soros.	52

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Frequência de reações positivas (Pos) e negativas (Neg) para cisticercose bovina no ELISA, de acordo com os tipos de ponto de corte e antígeno.....64

Tabela 2. Taxas de desempenho (%) do teste ELISA com 2 e 3 desvios-padrão (DP) obtidas pelo uso dos diferentes antígenos de *T. crassiceps* e grupos de soros-controle com base na inspeção *post mortem*.....65

Tabela 3. Frequência de reações negativas para a cisticercose bovina e especificidade do teste ELISA nas amostras de bovinos com diferentes patologias, de acordo com o antígeno e o ponto de corte.68

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Frequência de reação dos peptídeos no imunoblot em cada categoria de soro, utilizando antígeno total de larva de *T. crassiceps*.....79

Tabela 2. Taxas de desempenho dos peptídeos reativos no imunoblot, utilizando antígeno total de larva de *T. crassiceps*.81

RESUMO

SILVA, Letícia Ferreira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Diagnóstico imunológico da cisticercose bovina utilizando antígenos de *Taenia crassiceps*: avaliação de protocolos laboratoriais.** Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

A cisticercose bovina, causada pela forma larvar da *Taenia saginata*, constitui um problema atual na pecuária de corte brasileira, determinando prejuízos econômicos para a indústria da carne em decorrência da condenação de carcaças parasitadas, além de representar riscos à saúde pública. A principal medida de controle desta zoonose é aplicada após o exame *post mortem* realizado na rotina de inspeção de carnes, no entanto, este método apresenta falhas na detecção de cisticercos em casos de infecções discretas, reforçando a necessidade de pesquisas adicionais para o desenvolvimento de alternativas para o diagnóstico, como os testes sorológicos. Os objetivos deste estudo foram avaliar diferentes protocolos laboratoriais do ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina utilizando antígenos de larva de *Taenia crassiceps* (Tcra), avaliar o seu desempenho frente a diferentes categorias de soros-controle de bovinos abatidos e, através do immunoblot, identificar os peptídeos com importante potencial diagnóstico para a cisticercose bovina. Amostras de soro de bovinos experimentalmente infectados com ovos de *T. saginata* e negativos para a cisticercose também foram utilizadas na avaliação de diferentes protocolos laboratoriais do ELISA, que envolveu seis antígenos de Tcra: total (T), total sonificado (Ts), total dialisado (Td), membrana (M), líquido vesicular (LV) e líquido vesicular sonificado (LVs). A partir de protocolos definidos previamente, foi avaliado o desempenho do ELISA numa etapa final com os antígenos T, Ts e M frente soros de bovinos positivos (experimentais e naturais) e negativos para a cisticercose e de bovinos com outras patologias. Os ensaios de immunoblot foram realizados, com o antígeno T, utilizando os quatro grupos de soros-controle e, em seguida, os peptídeos reativos foram identificados e estabelecidas as suas frequências e taxas de desempenho. Com a avaliação prévia dos protocolos ficaram definidas as concentrações de antígeno de 10 µg/ml para os antígenos LV e LVs e de 40 µg/ml para os antígenos T, Ts, Td e M; as diluições de conjugado estabelecidas foram 1:1.250 (T, Ts e M) e 1:2.500 (Td, LV e LVs); a melhor diluição de soro testada

foi 1:100 e a melhor substância bloqueadora, o leite em pó desnatado a 5%; e os antígenos que melhor diferenciaram animais positivos e negativos foram o M e o T, seguidos pelos antígenos Ts e Td. As taxas de sensibilidade obtidas pelo teste ELISA foram respectivamente, com 2 e 3 desvios-padrão, 85 e 81,25% para o antígeno T, 82,5 e 78,75% para o antígeno Ts e 80 e 80% para o antígeno M; as taxas de especificidade, com 2 e 3 desvios-padrão, foram respectivamente: 47,5 e 58,75% para o antígeno T, 65 e 73,75% para o antígeno Ts e 58,75 e 62,5% para o antígeno M. Já no imunoblot os peptídeos de maior importância diagnóstica, em ordem decrescente de acurácia foram: 6-8 kDa (90,8%), 129-143 kDa (74,2%), 99-105 kDa (71,7%) e 14-19 kDa (71,1%). A combinação adequada dos diversos parâmetros testados contribuiu para ampliar a confiabilidade do teste ELISA, uma vez que facilita a diferenciação entre animais positivos e negativos. Estes protocolos proporcionaram altas taxas de sensibilidade o que facilita a aplicabilidade prática do teste, pois complementa o exame *post mortem* que apresenta alta especificidade, porém baixa sensibilidade em detectar carcaças com infecções discretas. Os resultados obtidos pelo imunoblot mostraram que o antígeno T possui peptídeos com alto potencial diagnóstico, sendo, portanto, outro teste sorológico útil no diagnóstico da cisticercose bovina.

ABSTRACT

SILVA, Leticia Ferreira da, M.Sc., Universidade Federal Viçosa, March 2013. **Immunological diagnosis of bovine cysticercosis using antigens of *Taenia crassiceps*: evaluation of laboratory protocols.** Adviser: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

The bovine cysticercosis, caused by the larval form of *Taenia saginata*, is a current problem in Brazilian beef cattle, determining economic losses to the meat industry due to the carcass condemnation, also represents risks to public health. The main control measure of this zoonosis is applied after *post-mortem* examination at meat inspection; however, this method fails in detecting cysticerci in cases of low infections, reinforcing the need for additional research to develop alternatives for diagnosis, such as serological tests. The objectives of this study were: to evaluate different laboratory protocols of ELISA for the diagnosis of bovine cysticercosis using *Taenia crassiceps* (Tcra) larvae antigens to assess their performance against different categories of control sera from slaughtered cattle and, through immunoblotting, to identify peptides with significant diagnostic potential for bovine cysticercosis. Serum samples of cattle experimentally infected with eggs of *T. saginata* and negative for cysticercosis were also used in the evaluation of different laboratory protocols of ELISA, which involved six antigens of Tcra: total (T), total sonicated (Ts), total dialysate (Td), membrane (M), vesicular fluid (VF) and sonicated vesicular fluid (sVF). From previously defined protocols, we evaluated the performance of ELISA in a final step with the antigens T, Ts and M against sera of positive bovines (experimental and natural) and negative for cysticercosis, and of bovine with other pathologies. The immunoblotting assays were conducted with the T antigen, using four groups of control sera and then reactive peptides were identified and their frequencies and performance ratios were set. With previous evaluation of the protocols we have defined antigen concentrations of 10 µg/ml for VF and sVF antigens and 40 µg/ml for T, Ts, Td and M antigens; the established conjugate dilutions were 1:1.250 (T, Ts and M) and 1:2,500 (Td, VF and sVF); the best serum dilution tested was 1:100 and the best blocking substance was 5% skimmed milk powder; and the antigens that best differed positive and negative animals were M and T antigens, followed by Ts and Td. The sensitivity rates obtained by ELISA were, respectively, with 2 and 3

standard deviations, 85 and 81.25% for T antigen, 82.5 and 78.75% for Ts antigen, and 80 and 80% for M antigen; specificity rates, with 2 and 3 standard deviations, were, respectively: 47.5 and 58.75% for T antigen, 65 and 73.75% for Ts antigen, and 58.75 and 62.5% for M antigen. In the immunoblotting, the most important diagnostical peptides, in descending order of accuracy were: 6-8 kDa (90.8%), 129-143 kDa (74.2%), 99-105 kDa (71.7%) and 14-19 kDa (71.1%). The suitable combination of various tested parameters contributed to increase the reliability of the ELISA test, once it facilitates the distinction between positive and negative animals. These protocols provided high sensitivity rates, which enables the practical applicability of the test, because it complements the *post-mortem* examination that shows high specificity, but low sensitivity in detecting carcasses with discrete infections. The results obtained by immunoblotting showed that the T antigen has peptides with a high diagnostic potential; hence, another serological test is useful in the diagnosis of bovine cysticercosis.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil vem apresentando crescimento constante na receita das exportações de carne bovina. Dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (Abiec), divulgados em janeiro de 2013, confirmam incremento de 7,33% na receita das exportações de 2012 em relação a 2011 (Abiec, 2013). As estatísticas também indicam crescimento para os próximos anos, com aumento de 2,15% ao ano nas exportações.

Para manter esta participação no mercado internacional, é necessário atender, cada vez mais, as exigências quanto à qualidade e segurança dos alimentos. No entanto, algumas zoonoses ainda apresentam destacável prevalência no país, como é o caso da cisticercose bovina, que gera danos à saúde pública e prejuízos econômicos à cadeia produtiva da carne em decorrência das perdas em carcaças parasitadas. Isto tem como consequência a depreciação do valor do produto, além de restringir a comercialização dos frigoríficos, principalmente em se tratando do mercado externo (Fukuda, 2003).

O controle da cisticercose bovina é feito por meio do exame anatomopatológico realizado durante a rotina de inspeção *post mortem* em Matadouros-Frigoríficos. Entretanto, esta metodologia da inspeção de carnes apresenta baixa sensibilidade em detectar carcaças com infecção discreta, o que pode resultar na liberação de carcaças contaminadas para o comércio (Dorny et al., 2009). Com isso, grandes esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de testes que possam ser realizados durante ou após a inspeção *ante mortem*, com o objetivo de auxiliar na destinação adequada dessas carcaças.

Entre as opções para auxiliar no melhor controle deste parasita, estão incluídas as técnicas sorológicas como o ELISA e o immunoblot. Ambas vêm sendo amplamente utilizadas por pesquisadores com resultados promissores nesta área. Contudo, estes testes ainda não são usados na rotina de diagnóstico da cisticercose bovina por não estarem disponíveis comercialmente ou completamente validados, seja por não apresentarem taxas de desempenho satisfatórias ou por estes dados não serem suficientemente divulgados. Sendo a carne a única fonte de infecção humana, é importante o aprimoramento e padronização destes testes sorológicos no diagnóstico da cisticercose bovina

para que estes possam auxiliar no exame *post mortem*, aumentando a confiabilidade do diagnóstico.

Com o objetivo de aprimorar duas das técnicas de imunodiagnóstico que vêm sendo utilizadas em maior frequência no diagnóstico da cisticercose bovina realizou-se esta pesquisa. Nesta foram avaliados protocolos laboratoriais do ELISA e imunoblot, utilizando antígenos heterólogos de larva de *Taenia crassiceps*, frente a diferentes grupos de soros-controle de bovinos. Avaliou-se, também, a aplicabilidade dos protocolos laboratoriais do ELISA e imunoblot, observando as suas taxas de desempenho em animais naturalmente infectados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos biológicos da *Taenia saginata*

A *Taenia saginata* é um parasito pertencente à ordem Cyclophyllidea, à classe Cestoidea, à família Taeniidae e ao gênero *Taenia*. Trata-se de um cestóide achatado em forma de fita, com 4 a 12 metros de comprimento, segmentado e de cor branca, podendo ser levemente rosado ou amarelado, de superfície lisa e brilhante ou eventualmente enrugada (Delpy et al., 2005; Rey, 2008).

O corpo da *Taenia saginata* é dividido em (Figura 1): escólex, com 1 a 2 mm de diâmetro, provido de quatro ventosas que permitem a fixação à mucosa intestinal do hospedeiro definitivo; o colo, região delgada e de crescimento do corpo do helminto; proglotes jovens, proglotes mais recentemente formadas e sem qualquer indício de aparelho genital; proglotes maduras, inteiramente formadas; e as proglotes grávidas, que contêm os ovos da tênia, cerca de 50.000 a 100.000 por proglote. O estróbilo pode conter uma cadeia de 1.000 a 2.000 proglotes (Delpy et al., 2005; Rey, 2008).

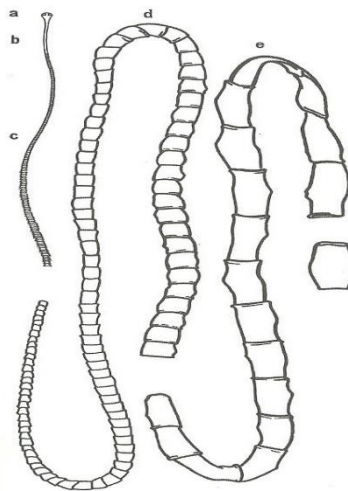


Figura 1. Segmentos do estróbilo da *Taenia saginata*: a, escólex; b, colo; c, proglotes jovens; d, proglotes maduras; e, proglotes grávidas (Fonte: Rey, 2008).

Nos últimos anéis do estróbilo (proglotes grávidas), aproximadamente 50% dos ovos são maduros, 40% são ovos imaturos e 10% são ovos estéreis (Delpy et al., 2005). Os ovos são esféricos a ovais, medindo de 35 a 43 μm de

diâmetro, com uma casca grossa radialmente estriada e contendo um embrião chamado de oncosfera (WHO, 1998).

A larva da *Taenia saginata*, denominada cisticerco, consiste de uma cápsula fibrosa contendo líquido translúcido e a forma germinativa da tênia, o escólex invaginado. Possui forma ovoide a alongado, de acordo com a pressão do tecido em torno. Em cerca de 60 a 75 dias após a infecção do bovino, o cisticerco se apresenta totalmente desenvolvido com 7 a 1 mm de comprimento por 4 a 6 mm de largura. Os cistos não viáveis em processo de degeneração podem variar na aparência de acordo com o grau de inflamação, necrose e mineralização na lesão resultante (Pfuetzenreiter e Ávila-Pires, 2000; OIE, 2008; Rey, 2008).

2.2. Características epidemiológicas do complexo teníase-cisticercose bovino

O complexo teníase-cisticercose bovino é um importante complexo zoonótico do ponto de vista veterinário e de saúde pública. É composto por duas apresentações clínicas distintas: a teníase, causada pela forma adulta da *Taenia saginata*, que se desenvolve no intestino delgado do hospedeiro definitivo (homem) e a cisticercose, causada pela forma larvar da tênia, que compromete os tecidos musculares do hospedeiro intermediário (bovino) (Carvalho et al., 2006).

2.2.1. Ciclo evolutivo da *Taenia saginata*

O ciclo evolutivo da *T. saginata* depende exclusivamente da ligação entre homem e gado (Hoberg, 2002; Dorny et al., 2009) e inclui o estágio adulto no hospedeiro definitivo, os ovos no ambiente e o cisticerco no hospedeiro intermediário, havendo, portanto, três fases com relação à população de parasitas (Figura 2) (Pfuetzenreiter e Ávila-Pires, 2000).

O homem adquire a teníase ao ingerir carne bovina crua ou insuficientemente aquecida (temperatura inferior a 60°C) contendo cisticercos viáveis (Dorny et al., 2009). O escólex se desenvolve sob ação da bile e se fixa à mucosa intestinal, e, cerca de três meses após a infecção, o parasita torna-se adulto e as proglotes contendo ovos são eliminadas junto às fezes ou, então, liberadas por migração natural pelo ânus (Delpy et al., 2005; Dorny e

Praet, 2007). Uma vez contaminado, o homem pode liberar cerca de 700.000 ovos por dia (Pfuetzenreiter e Ávila-Pires, 2000).

A tênia apresenta vida média de 20 a 30 anos no intestino do hospedeiro definitivo (Hoberg, 2002; Delpy et al., 2005) e os ovos podem permanecer viáveis no esgoto, na água e nas pastagens por vários meses (Flisser et al., 2005).

Os bovinos são infectados ao ingerirem, direta ou indiretamente, fezes humanas contendo ovos. As fezes podem contaminar cursos de água e pastagens, levando a disseminação dos ovos e facilitando a ingestão pelos bovinos. Após a ingestão, os embriões se libertam dos ovos no intestino delgado, através da ação dos sucos digestivos e da bile, e penetram a mucosa intestinal difundindo-se pela corrente sanguínea. O cisticerco então se aloja e desenvolve nas musculaturas cardíaca e esquelética dos bovinos (Pfuetzenreiter e Ávila-Pires, 2000; Delpy et al., 2005; Rey, 2008).

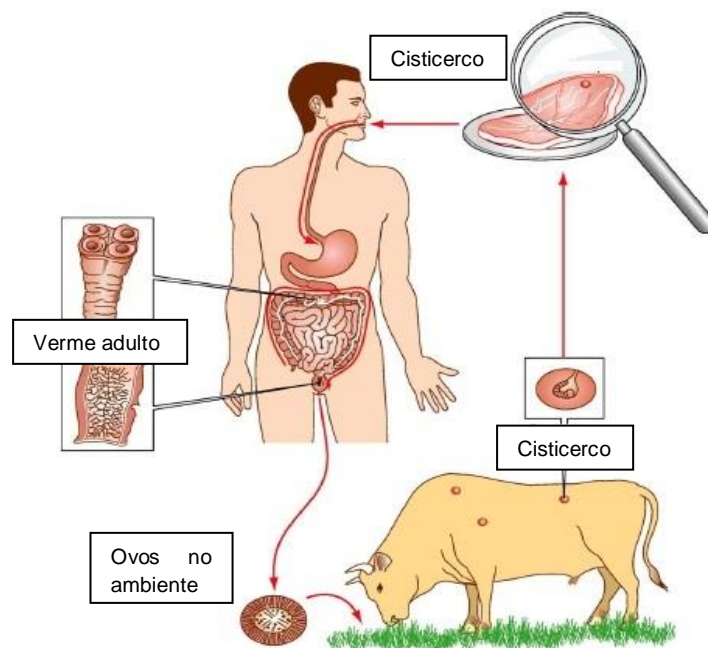


Figura 2. Ciclo evolutivo da *Taenia saginata* (Fonte: Adaptado de Delpy et al., 2005).

2.2.2. Fatores de risco para a ocorrência do complexo teníase-cisticercose bovino

Entre os fatores de risco associados à ocorrência destas zoonoses estão a precariedade das condições sanitárias e o baixo nível sócio-econômico-cultural da população (Pereira et al., 2006), assim como o comércio mundial e

viagens para áreas endêmicas. A reciclagem de esgoto humano em pastagens também aumenta o risco de infecção do rebanho (Scandrett et al., 2009).

Como no Brasil o principal sistema de criação utilizado na pecuária de corte é o extensivo, os animais têm livre acesso às pastagens e aos córregos e rios que podem estar contaminados por fezes humanas, o que facilita a ocorrência da cisticercose (Dutra et al., 2012). A inundação de pastagens e a proximidade de águas residuais dos efluentes também são variáveis importantes para a presença da cisticercose bovina em um rebanho (Boone et al., 2007).

Outros fatores determinantes são higiene pessoal incorreta, criação de animais próxima ao homem, além do abate e comércio clandestino de carnes (Monteiro et al., 2006). As práticas culinárias e os hábitos alimentares também afetam a transmissão do complexo, uma vez que os cisticercos não resistem a altas temperaturas, pessoas que comem carne crua ou mal aquecida são mais propensas a adquirir teníase (Dorny e Praet, 2007).

2.2.3. Prevalência da cisticercose bovina

A cisticercose bovina é uma zoonose que apresenta distribuição cosmopolita (Dorny et al., 2009; Ogunremi e Benjamim, 2010) com prevalência variando entre menor que 1 a maior que 10% (Pawlowski e Schultz, 1972), sendo maiores em países em desenvolvimento, como regiões da África, América Latina, Ásia e Mediterrâneo (Dorny et al., 2002; Murrel, 2005).

As informações sobre prevalência e procedência dos animais infectados provêm dos registros nosográficos dos Serviços de Inspeção Sanitária (Dorny et al., 2009; Costa et al., 2012).

No Brasil, a cisticercose bovina é a doença de maior ocorrência em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF) (Fukuda, 2003; Souza et al., 2007). Entre os anos de 2007 a 2010, a média da prevalência desta parasitose foi de 1,05%, variando entre os estados e o período de avaliação (Dutra et al., 2012).

A prevalência da cisticercose bovina em Minas Gerais no período de 1979 a 1993 a partir de dados obtidos do Serviço de Inspeção Federal segundo Reis et al. (1996) foi de 2,79% de animais infectados; enquanto no período de 1990 a 1994 esta prevalência no mesmo estado aumentou para 4,15% (Souza, 1997). Segundo dados de um Matadouro-Frigorífico sob inspeção federal

situado no Triângulo Mineiro analisados por Carvalho et al. (2006), a prevalência de cisticercose bovina durante os anos de 2000 a 2003 foi de 4,6%.

Em um levantamento estatístico dos dados nosográficos do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Souza et al. (2007) observaram que a prevalência da cisticercose bovina no estado do Paraná variou de 2 a 2,5% na década de 50 para 4,6 a 7,7% em 1999. Já no período de 2004 a 2008, a prevalência encontrada foi de 2,23% (Guimarães-Peixoto et al., 2012) e entre 2007 a 2010, a média foi de 2,91% bovinos acometidos (Dutra et al., 2012).

Em São Paulo, segundo dados do SERPA-SP, as prevalências da cisticercose bovina nos anos 1980, 1981 e 1982 eram respectivamente: 3,86%, 4,16% e 4,18%. Em 1986 dados de um Matadouro-Frigorífico sob responsabilidade do SIF, mostraram uma prevalência de 5,5% no estado (Ungar e Germano, 1992). Já entre os anos de 2007 a 2010, a prevalência reduziu para 3,34% segundo dados coletados por Dutra et al. (2012).

Em Mato Grosso do Sul, entre 2007 a 2010, a prevalência para a cisticercose bovina encontrada foi 1,34% (Dutra et al., 2012).

No Rio de Janeiro, no período entre 1997 e 2003, foi encontrada uma prevalência de 1,95% para a cisticercose a partir de dados de abates de bovinos (Pereira et al., 2006) e manteve-se próxima a este valor entre 2007 a 2010, alcançando o total de 1,13% de bovinos infectados (Dutra et al., 2012).

Durante os anos de 2000 a 2005, 199.065 bovinos foram abatidos no estado de Alagoas em Matadouros-Frigoríficos sob SIF, resultando em uma prevalência de 0,32% a 0,65% no estado (Oliveira et al., 2011). Entre 2007 a 2010, de 108.808 bovinos abatidos, apenas oito estavam infectados com cisticercose, reduzindo a prevalência no estado para 0,1% (Dutra et al., 2012).

Dados nosográficos do período de 2004 a 2006 de um Matadouro-Frigorífico sob SIF situado no município de Jequié, Bahia, revelaram prevalência de 1,74% de cisticercose bovina. Além disso, 51,31% dos casos de condenação de órgãos bovinos foram em decorrência da cisticercose (Santos et al., 2008). No município de Teixeira de Freitas, do mesmo estado, no mês de outubro de 2005, a prevalência foi de 4,20% (Almeida et al., 2006).

Muitos estudos relatam a baixa sensibilidade da inspeção, o que resulta em uma subestimação da prevalência da cisticercose bovina numa escala de 3

a 10% (Dorny et al., 2009), ainda assim, a cisticercose bovina é endêmica em vários estados brasileiros e o risco de contaminação está diretamente relacionado com as principais áreas de criação de bovinos (Dutra et al., 2012).

2.3. Importância econômica da cisticercose bovina

O impacto econômico do complexo teníase-cisticercose bovino pode ser dividido em três categorias: custo devido à doença em humanos; custo devido à doença nos bovinos, causando perdas na produção e condenações em matadouros; e custos dos programas de controle para eliminar ou erradicar a doença (Eddi et al., 2006).

Embora o parasita não leve a uma doença clínica nos bovinos infectados, a cisticercose bovina tem grande importância econômica para a indústria da carne. Quando detectada durante a rotina de inspeção gera efeitos irreversíveis, o que resulta em consideráveis perdas econômicas devido à condenação total de carcaças infectadas, ou a depreciação do valor da carne quando o seu destino é a salga, conserva ou congelamento (Onyango-Abuje et al., 1996; Dorny et al., 2009; Ogunremi e Benjamim, 2010; Allepuz et al., 2012; Dutra et al., 2012).

No Brasil, no período entre 1993 e 1997, a cisticercose foi registrada como a principal causa de condenação de carcaças bovinas em Matadouros-Frigoríficos de Minas Gerais (Queiroz et al., 2000). O mesmo se sucedeu em outros momentos e regiões (Santos et al., 2008). Supondo um abate mensal com cerca de 12.000 cabeças com uma média de 1,5% de carcaças congeladas, o prejuízo pode ser de R\$ 232.000,00 por mês. Ainda, de acordo com a destinação das carcaças parasitadas o produto comercializado pode apresentar diferentes depreciações: carcaças destinadas ao tratamento pelo frio têm perdas de 20% no valor do traseiro com osso e de 15% no valor do dianteiro com osso, enquanto em carcaças destinadas à conserva essa perda é muito maior, podendo chegar a 65% (Queiroz et al., 2000; Miranda, 2002).

Em estudo realizado por Fukuda (2003), estimou-se que o valor total gasto pelo frigorífico com o tratamento pelo frio de carcaças parasitadas ficou em torno de U\$ 203.023,54. Nesse mesmo estudo o autor constatou que, para cada carcaça contaminada, o frigorífico perde o valor de U\$23,27, valor equivalente a 7,7% do total pago ao produtor por uma carcaça sadia.

De acordo com Guimarães-Peixoto et al. (2012), durante o período de 2004 a 2008, foram condenados 29.708.550 kg de carne bovina no estado do Paraná em decorrência da cisticercose bovina. A partir de estimativas do valor da arroba (R\$ 97,00) e do peso da carcaça (225 kg), os autores concluíram que estas condenações corresponderam a um prejuízo de 132.038 carcaças e R\$ 192.115.290,00 para a indústria da carne somente neste período.

Estima-se uma perda anual de U\$ 420.000.000,00 na América do Sul em decorrência da cisticercose (Pereira et al., 2006) e de U\$ 2.000.000.000,00 no mundo, provando que a cisticercose ainda consiste em problema global para a economia e segurança alimentar (Hoberg, 2002).

2.4. Diagnóstico e controle da cisticercose bovina

A principal estratégia de controle do complexo teníase-cisticercose bovino consiste em interromper o ciclo evolutivo do parasita, a fim de evitar a contaminação dos animais e da população humana (Bonay et al., 2002). Logo, uma intervenção bem sucedida depende de multiplicidade de medidas que devem ser dirigidas às etapas deste ciclo, considerando que a *Taenia saginata* só se desenvolverá se o homem ingerir carne infectada com a sua forma larvar (Gemmell, 1987; Dorny e Praet, 2007; Asaava et al., 2009). As medidas de controle, em geral, são priorizadas para a teníase humana e consistem em saneamento adequado, educação da população, cocção adequada da carne, além da inspeção sanitária de carnes juntamente com o diagnóstico e tratamento da teníase humana (Pfuetzenreiter e Ávila-Pires, 2000; Hoberg, 2002).

A rotina de inspeção *post mortem* em Matadouros-Frigoríficos é a principal medida de controle da cisticercose bovina adotada atualmente (Scandrett et al., 2009; McFadden et al., 2011). O artigo 176 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (Brasil, 1997) estabelece as normas do diagnóstico, que consiste no exame anatomopatológico dos músculos da carcaça que representam os sítios de predileção do cisticercose: músculos mastigatórios, língua, coração e porção muscular do diafragma e seus pilares.

No julgamento das carcaças, há três destinos possíveis: condenação, quando há infecção intensa (um ou mais cistos numa área correspondente a

aproximadamente à palma da mão); rejeição parcial e congelamento (15 dias a uma temperatura de -10 °C), em casos de infecção discreta (até um cisticerco encontrado na rotina de inspeção; quando este for calcificado, não é necessário o congelamento); e esterilização pelo calor ou salga, durante 10 a 21 dias, em casos de número intermediário de cisticercos (Brasil, 1997).

No entanto, diversas pesquisas demonstraram que os procedimentos de inspeção *post mortem* para cisticercose bovina têm baixa sensibilidade, variando de 10 a 50% nos casos de carcaças com infecções discretas (Abuseir et al., 2006; Scandrett et al., 2009; Eichenberger et al., 2011; Calvo-Artavia et al., 2012). A inspeção não permite detectar todos os cisticercos, visto que, por razões comerciais, o inspetor não retalha todos os órgãos, vísceras e carcaças submetidos à rotina de inspeção, além do fato do estágio de degeneração do cisticerco e da habilidade do inspetor influenciarem neste resultado (Rodrigues, 1993; Dorny e Praet, 2007).

2.5. Diagnóstico imunológico da cisticercose bovina

Devido às falhas apresentadas pelas técnicas convencionais de inspeção em detectar bovinos com infecção discreta para a cisticercose, alguns esforços têm sido direcionados no desenvolvimento e validação de testes sorológicos como uma alternativa ao método *post mortem*, para serem usados como ferramenta de rotina no diagnóstico da cisticercose bovina (Draelants et al., 1995; Abuseir et al., 2007; Dorny et al., 2010).

Para serem empregados no diagnóstico de qualquer enfermidade, os testes imunológicos devem apresentar altas taxas de sensibilidade e especificidade, além de utilizar reagentes estáveis, serem práticos e econômicos (Macedo et al., 2002). Além disso, o custo da implantação de uma técnica mais sensível para o diagnóstico da cisticercose bovina deve ser levado em consideração quando se foca nos benefícios da diminuição de risco para a saúde pública, na potencial quebra do ciclo do parasita e, em longo prazo, na redução dos prejuízos econômicos para a indústria da carne (Asaava et al., 2009; Allepuz et al., 2012).

Ogunremi e Benjamin (2010) sugerem que as limitações da rotina de inspeção seriam resolvidas se um teste sorológico confiável estivesse disponível para uso em animais ainda vivos. Alguns testes imunológicos têm

sido propostos para esta finalidade (Minozzo et al., 2004), entre os que vêm sendo usados com maior frequência para detecção da cisticercose são o ELISA e o Immunoblot.

2.5.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

O teste ELISA vem sendo amplamente utilizado para o diagnóstico imunológico da cisticercose bovina por ser útil para a utilização em rotina laboratorial. Este teste se presta para uso no diagnóstico em larga escala, quando o procedimento é mecanizado e automatizado em conjunto com uma leitura mais objetiva dos resultados por um espectrofotômetro (Geerts et al., 1981b).

Geerts et al. (1981b) ao avaliarem o desempenho do ELISA no diagnóstico da cisticercose bovina, encontraram sensibilidade de 96,9% para animais experimentalmente infectados com ovos de *T. saginata* e apenas 37,5% para animais positivos naturais, portadores de infecções discretas; quanto a especificidade, foram analisados 100 soros de animais declarados negativos para a cisticercose pela inspeção visual, sendo que seis apresentaram reações falso-positivas, no entanto, três apresentavam lesões por metacestódeos de *T. saginata* que não foram detectadas durante o abate dos animais.

Monteiro et al. (2006) utilizaram o teste ELISA para avaliar a detecção de anticorpos em bovinos experimentalmente e naturalmente infectados com ovos de *T. saginata*, encontrando as respectivas taxas de sensibilidade: 75 a 90% e 5 a 31,6%. Já a especificidade do teste variou de 81,4 a 88,6%. Assim, o teste ELISA pode ser útil na diferenciação da cisticercose com outras doenças devido a sua alta taxa de especificidade. Resultados similares foram observados por Ogunremi e Benjamin (2010) os quais encontraram 92,9% de sensibilidade ao testar soros de animais experimentalmente infectados com diferentes doses de ovos de *T. saginata* e 90,6% de especificidade, estimada a partir de soros de animais negativos para cisticercose, indicando que o ELISA seria adequado para uso em campo para investigações de surtos.

Em outra pesquisa, Thomaz-Soccol et al. (2010), ao avaliarem a presença de anticorpos em bovinos que apresentaram cistos na inspeção *post mortem*, encontraram taxas de desempenho altamente satisfatórias, concluindo que o ELISA foi mais sensível do que a inspeção visual realizada no

Matadouro-Frigorífico. Abuseir et al. (2007), também encontraram elevadas sensibilidade e especificidade pelo ELISA, ao identificar anticorpos em amostras de bovinos positivos para a cisticercose, concluindo que o ELISA é um teste sensível e confiável para o diagnóstico da cisticercose bovina. Em decorrência dessa alta sensibilidade, o ELISA tem sido utilizado por alguns pesquisadores (Hughes et al., 1993; Dorny et al., 2002; Acevedo Nieto et al., 2012) para determinar a prevalência da cisticercose bovina em diferentes regiões.

Alguns pesquisadores realizaram estudos comparativos entre a prevalência da cisticercose bovina encontrada pela inspeção *post mortem* e pelo Ag-ELISA (direto). Os resultados revelaram que a soro-prevalência, detectada através da presença de antígenos circulantes nos bovinos, foi cerca de três (Onyango-Abuje et al., 1996), 10 (Dorny et al., 2000), 20 (Asaava et al., 2009) ou 50 (Allepuz et al., 2012) vezes superior à prevalência obtida pela inspeção visual, tornando esta técnica útil para pesquisas epidemiológicas. Estes estudos demonstram que a prevalência fornecida pela inspeção é subestimada, uma vez que detecta apenas uma pequena fração das carcaças contaminadas (Dorny et al., 2000).

Draelants et al. (1995) ao realizarem o Ag-ELISA para diagnóstico de animais experimentalmente infectados com ovos de *T. saginata*, verificaram diferenças nas sensibilidades obtidas para animais com mais de 100 cisticercos viáveis (83,3%) e com menos (18,2%). Animais com cistos não viáveis não foram detectados pelo teste. A taxa de especificidade obtida foi de 90,3% quando analisados soros de bovinos com outras doenças que não a cisticercose.

A técnica de Ag-ELISA permite detectar apenas animais com cistos viáveis, mas, de acordo com a legislação, tanto as carcaças com cistos viáveis quanto as com cistos degenerados devem ser julgadas para a cisticercose (Brandt et al., 1992; Dorny e Praet, 2007). Assim, o ELISA indireto, capaz de detectar anticorpos contra a forma larvar da *T. saginata*, apresenta vantagem em relação ao Ag-ELISA, uma vez que é capaz de detectar animais tanto com cisticercos viáveis quanto degenerados.

Contudo, estudos anteriores demonstraram que o ELISA permite detectar anticorpos apenas em animais infectados experimentalmente com altas doses de ovos, falhando em detectar animais naturalmente infectados,

que apresentam, na maioria das vezes, infecção discreta (Geerts et al., 1981b; Smith et al., 1991; Onyango-Abuje et al., 1996; Monteiro et al., 2006; Asaava et al., 2009; Allepuz et al., 2012). Além disso, o fato dos animais infectados apresentarem baixos níveis de anticorpos ao longo da infecção mostra que o ELISA poderia falhar no diagnóstico de alguns animais em fase crônica, porém ao associar à inspeção de rotina, este método poderia melhorar o controle da cisticercose bovina (Minozzo et al., 2004).

2.5.2. Immunoblot

O immunoblot muitas vezes é considerado um teste mais sensível e específico que o ELISA, apresentando resultados superiores no diagnóstico da cisticercose por *Taenia solium* (Gottstein et al., 1987; Pathak et al., 1994; Macedo et al., 2002).

Giroto et al. (2009) ao realizarem o immunoblot na avaliação da reatividade de soros de bovinos experimentalmente infectados com ovos de *T. saginata* e de bovinos negativos para a cisticercose, encontraram peptídeos de baixa massa molecular que proporcionaram altas taxas de desempenho no diagnóstico da cisticercose bovina, ou seja, peptídeos de 4-6, 14 e 18kDa que mostraram especificidade média de 97,5% e sensibilidades de 66,7, 87,5 e 75,5% respectivamente. O immunoblot mostrou grande potencial para o diagnóstico da cisticercose bovina, tornando-se uma alternativa a ser realizada em estudos epidemiológicos da doença.

Brandt et al. (1992) verificaram reação de anticorpos monoclonais contra o antígeno secretor-excretor de larva de *T. saginata* sendo possível reconhecer os componentes antigênicos de 65, 87 e 100 kDa. Já Vicentini-Oliveira et al. (2010), utilizando antígenos bruto e de líquido vesicular de larva de *T. saginata*, verificaram que anticorpos monoclonais reagiram com proteínas de baixa massa molecular (<18 kDa) e também com as proteínas de 43, 55, 66 e 100 kDa.

Apesar dos resultados altamente positivos, o immunoblot ainda é pouco utilizado no diagnóstico da cisticercose bovina, sendo o seu uso já bastante difundido e bem sucedido nos diagnósticos da cisticercose suína e humana.

Estudos realizados por Pathak et al. (1994) desenvolveram o immunoblot para diagnóstico da cisticercose suína utilizando antígeno bruto de larva de *T. solium*. Quatro peptídeos de baixa massa molecular, 8, 11, 16 e 23

kDa, foram especificamente reconhecidos por suínos com cisticercose. A sensibilidade obtida por estes peptídeos foi de 90% e a especificidade de 100%, sugerindo que o teste pode ser útil no diagnóstico *ante mortem* da cisticercose suína. Pinto et al. (2001) também utilizaram o immunoblot para o diagnóstico da cisticercose suína, no entanto utilizaram antígeno bruto de larva de *T. crassiceps*. Os resultados obtidos foram 100% de sensibilidade e 96,7% de especificidade, sendo os peptídeos de maior importância diagnóstica os de 72-68 kDa, seguidos dos peptídeos de baixa massa molecular, 16-15, 39-36, 18-17, 21, 14, 25-23 e 20-19 kDa.

Tsang et al. (1989) desenvolveram immunoblot para o diagnóstico da cisticercose humana, constituído de sete glicoproteínas, encontrando 98% de sensibilidade e 100% de especificidade. A amostra foi considerada positiva quando houve reação com qualquer uma dessas glicoproteínas. Após este estudo, Tsang et al. (1991) utilizaram este protocolo previamente definido e avaliaram a eficácia do mesmo para o diagnóstico da cisticercose suína, obtendo 100% de sensibilidade e especificidade.

Larralde et al. (1989) concluíram em seu estudo que a banda 108 kDa, utilizando o antígeno de larva de *T. solium*, e a banda de 88 kDa, utilizando o antígeno de larva de *T. crassiceps*, são as mais específicas para o diagnóstico da neurocisticercose humana

Ito et al. (1998) avaliaram o desempenho do immunoblot no diagnóstico da neurocisticercose, encontrando 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Todos os indivíduos positivos reagiram com as bandas 10 e 26 kDa. Ito et al. (1999) também utilizaram o immunoblot para detectar suínos com cisticercose. Os autores verificaram que os soros de todos os animais infectados mostraram respostas similares aos de humanos com neurocisticercose, sendo que as bandas mais frequentes também foram as de 10 e 26 kDa.

Macedo et al. (2002) realizaram o immunoblot com diferentes preparações antigênicas para o diagnóstico da neurocisticercose humana. Os antígenos de glicoproteínas de larva de *T. solium* e *T. crassiceps* apresentaram os mesmos resultados, 86% de sensibilidade e 99% de especificidade. Foram considerados positivos os soros que reagiram com as bandas de 14 e 18 kDa. Pardini et al. (2002) e Peralta et al. (2010) encontraram 100% de especificidade

para estas mesmas bandas ao realizarem o immunoblot com antígenos de larvas de *T. crassiceps* para o diagnóstico da neurocisticercose.

Bueno et al. (2000) obtiveram 98 a 98,5% de sensibilidade para o diagnóstico da neurocisticercose utilizando antígeno de larva de *T. crassiceps* e 96,9 a 100% utilizando antígeno de larva de *T. solium*.

2.5.3. Antígenos empregados no imunodiagnóstico da cisticercose bovina

Uma vez que o antígeno possui um papel crucial na execução de um teste desenvolvido para detectar anticorpos no soro, muitos estudos têm se concentrado em avaliar e comparar diferentes preparações antigênicas disponíveis (Ogunremi e Benjamin, 2010).

Entre estes estudos para o diagnóstico da cisticercose bovina, em algumas pesquisas resultados promissores foram alcançados usando antígenos homólogos derivados da larva de *T. saginata* (Onyango-Abuje et al., 1996; Minozzo et al., 2004; Girotto, 2007; Ogunremi e Benjamin, 2010) e antígenos heterólogos de larvas de *T. crassiceps* (Geerts et al., 1981a; Minozzo et al., 2004; Monteiro et al., 2006; Girotto et al., 2009), de *T. hydatigena* (Bøgh et al., 1995) e de *T. solium* (Minozzo et al., 2004; Monteiro et al., 2006; Monteiro et al., 2007).

Geerts et al. (1981a) relataram que antígenos heterólogos de *T. crassiceps* podem ser mais eficazes no diagnóstico da cisticercose bovina, uma vez que propicia resultados mais específicos do que os antígenos homólogos de *T. saginata*.

O antígeno de larva de *T. crassiceps*, que apresenta peptídeos em comum com a larva de *T. saginata*, vem facilitando os ensaios laboratoriais. O uso deste antígeno heterólogo apresenta vantagens sobre o homólogo, por poder ser mantido em laboratório por meio da inoculação em camundongos e apresentar homogeneidade entre os lotes preparados; enquanto os antígenos de larva de *T. saginata* são difíceis de obter de carcaças de bovinos infectados, que muitas vezes apresentam grau de infecção leve, sendo dificultoso manter a sua produção, além de não permitir uma homogeneidade entre os lotes (Geerts et al., 1981b; Monteiro et al., 2006; Girotto et al., 2009).

Assim, a consideração mais importante parece ser o tipo de antígeno a ser usado e não a espécie de *Taenia* da qual ele procede (Ogunremi e Benjamin, 2010).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. **Exportações brasileiras de carne bovina**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/download/Relatorioexportacao2012_jan_out.pdf>.

Acesso em: 14 jan. 2013.

ABUSEIR, S.; EPE, C.; SCHNIEDER, T.; KLEIN, G.; KÜHNE, M. Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: is it unequivocal?. **Parasitology Research**, v.99, n.4, p.405-409, 2006.

ABUSEIR, S.; KÜHNE, M.; SCHNIEDER, T.; KLEIN, G.; EPE, C. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. **Parasitology Research**, v.101, 131-137, 2007.

ACEVEDO NIETO, E.C.; FERREIRA, P.S.; SANTOS, T.O.; PEIXOTO, R.P.M.G.; SILVA, L.F.; FELLIPE, A.G.; PINTO, P.S.A.; CALDI, J.F.B. Prevalência do complexo teníase-cisticercose na zona rural de Matias Barbosa-MG. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.6, p.2307-2314, 2012.

ALLEPUZ, A.; GABRIEL, S.; DORNY, P.; NAPP, S.; JANSEN, F.; VILAR, M.J.; VIVES, L.; PICART, L.; ORTUÑO, A.; GUTIÉRREZ, J.; CASAL, J. Comparison of bovine cysticercosis prevalence detected by antigen ELISA and visual inspection in the North East of Spain. **Research in Veterinary Science**, v.92, p.393-395, 2012.

ALMEIDA, D.O.; IGREJA, H.P.; ALVES, F.M.X.; SANTOS, I.F.; TORTELLY, R. Cisticercose bovina em matadouro-frigorífico sob inspeção sanitária no município de Teixeira de Freitas-BA: prevalência da enfermidade e análise anatomopatológica de diagnósticos sugestivos de cisticercose. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, n.3, p.178-182, 2006.

ASAAVA, L.L.; KITALA, P.M.; GATHURA, P.B.; NANYINGI, M.O.; MUCHEMI, G.; SCHELLING, E. A survey of bovine cysticercosis/human taeniosis in Northern Turkana District, Kenya. **Preventive Veterinary Medicine**, v.89, p.197-204, 2009.

BØGH, H.O.; LIND, P.; SØNDERBY, B.V.; KYVSGAARD, N.C.; MAEDA, G.E.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P. Immunodiagnosis of *Taenia saginata* in cattles using hydrophobic antigens from *T. hydatigena* metacestode cyst fluid. **Applied Parasitology**, v.36, p.226-238, 1995.

BONAY, P.; GONZÁLEZ, L.M.; BENÍTEZ, L.; FOSTER, M.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GÁRATE, T. Genomic and functional characterisation of a secreted antigen of *Taenia saginata* oncospheres. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.121, p.269-273, 2002.

BOONE, I.; THYS, E.; MARCOTTY, T.; BORCHGRAVE, J.; DUCHEYNE, E.; DORNY, P. Distribution and risk factors of bovine cysticercosis in Belgian dairy and mixed herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.82, p.1-11, 2007.

BRANDT, J.R.A.; GEERTS, S.; DE DEKEN, R.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; BRIJS, L.; FALLA, N. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **International Journal for Parasitology**, v.22, n.4, p.471-477, 1992.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29-03-52, alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, nº 1.812 de 08-02-96 e nº 2.244 de 04-06-97. Brasília, 1997. 174p.

BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; MIELLE, S.R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.1, p.146-151, 2000.

CALVO-ARTAVIA, F.F.; NIELSEN, L.R.; ALBAN, L. Epidemiologic and economic evaluation of risk-based meat inspection for bovine cysticercosis in Danish cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Article in Press, 2012.

CARVALHO, L.T.; COSTA, R.F.R.; SANTOS, I.F.; CARVALHO, A.L.T. Prevalência de cisticercose em bovinos abatidos em matadouro-frigorífico sob inspeção federal em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, n.2, p.109-112, 2006.

COSTA, R.F.R.; SANTOS, I.F.; SANTANA, A.P.; TORTELLY, R.; NASCIMENTO, E.R.; FUKUDA, R.T.; CARVALHO, E.C.Q.; MENEZES, R.C. Caracterização das lesões por *Cysticercus bovis*, na inspeção *post mortem* de bovinos, pelos exames macroscópico, histopatológico e pela reação em cadeia da polimerase (PCR). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.6, p.477-484, 2012.

DELPY, R.; GUISSSET, M.; KLOTZ, F. Adult tapeworms. **EMC-Maladies Infectieuses**, v.2, p.11-32, 2005.

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

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

DORNY, P.; PRAET, N.; DECKERS, N.; GABRIEL, S. Emerging food-borne parasites. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.196-206, 2009.

DORNY, P.; VALLÉE, I.; ALBAN, L.; BOES, J.; BOIREAU, P.; BOUÉ, F.; CLAES, M.; COOK, A.J.C.; ENEMARK, H.; VAN DER GIESSEN, J.; HUNT, K.R.; HOWELL, M.; KIRJUSINA, M.; NÖCKLER, K.; POZIO, E.; ROSSI, P.; SNOW, L.; TAYLOR, M.A.; THEODOROPOULOS, G.; VIEIRA-PINTO, M.M.; ZIMMER, I.A. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of *Cysticercus* in animals and foodstuffs in the European Union. Scientific report submitted to EFSA, 2010.

DORNY, P.; VERCAMMEN, F.; BRANDT, J.; VANSTEENKISTE, W.; BERKVENS, D.; GEERTS, S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. **Veterinary Parasitology**, v.88, p.43-49, 2000.

DRAELANTS, E.; HOFKENS, E.; HARDING, E.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. **Research in Veterinary Science**, v.58, p.99-100, 1995.

DUTRA, L.H.; GIROTTO, A.; VIEIRA, R.F.C.; VIEIRA, T.S.W.J.; ZANGIROLAMO, A.F.; MARQUÊS, F.A.C.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO, O. The prevalence and spatial epidemiology of cysticercosis in slaughtered cattle from Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.5, p.1887-1896, 2012.

EDDI, C.; BALOGH, K.; LUBROTH, J.; AMANFU, W.; SPEEDY, A.; BATTAGLIA, D.; DOMENECH, J. Veterinary public health activities at FAO: Cysticercosis and echinococcosis. **Parasitology International**, v.55, p. 305-308, 2006.

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, p.989-992, 2011.

FLISSER, A.; CORREA, D.; AVILLA, G.; MARVILLA, P. Biology of *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Taenia saginata asiatica*. In: MURREL, K.D.; DORNY, P.; FLISSER, A.; GEERTS, S.; KYVSGAARD, N.C.; McMANUS, D.; NASH, T.; PAWLOWSKI, Z. **WHO/FAO/OIE Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis**. OIE, Paris, France, 2005. p.1-10.

FUKUDA, R.T. **Contribuição ao estudo da epidemiologia da cisticercose bovina na região administrativa de Barretos. Aspectos ambientais e econômicos**. 2003. 127f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

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

GEERTS, S.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; MORTELMANS, J. Serodiagnosis of *T. saginata* cysticercosis in experimentally infected cattle by enzyme linked immunosorbent assay. **Research in Veterinary Science**, v.30, n.3, p.288-293, 1981a.

GEMMELL, M.A. A critical approach to the concepts of control and eradication of echinococcosis/hydatidosis and taeniasis/cysticercosis. **International Journal for Parasitology**, v.17, n.2, p.465-472, 1987.

GIROTTO, A. **Avaliação do imunoblot no diagnóstico da cisticercose bovina**, 2007. 74f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

GIROTTO, A.; PINTO, P.S.A.; DIAS, J.C.O.; CHAVES, L.S.; FERREIRA, H.C.C. Detecção de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina no imunoblot. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1147-1151, 2009.

GOTTSTEIN, B.; ZINI, D.; SCHANTZ, P.M. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.38, p.299-303, 1987.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R.P.M.; SOUZA, V.K.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, T.O. Distribuição e identificação das regiões de risco para a cisticercose bovina no Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.10, 975-979, 2012.

HOBERG, E.P. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. **Microbes and Infection**, v.4, p.859-866, 2002.

HUGHES, G.; HOQUE, M.; TEWES, M.S.; WRIGHT, S.H.; HARRISON, L.J.S. Seroepidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Swaziland. **Research in Veterinary Science**, v.55, p.287-291, 1993.

ITO, A.; PLANCARTE, A.; MA, L.; KONG, Y.; FLISSER, A.; CHO, S.Y.; LIU, Y.L.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M.W.; SCHANTZ, P.M. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. **American Journal for Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, n.2, p.291-294, 1998.

ITO, A.; PLANCARTE, A.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; IKEJIMA, T.; PIAO, Z.X.; KANAZAWA, T.; MARGONO, S.S. ELISA and immunoblot using purified glycoproteins for serodiagnosis of cysticercosis in pigs naturally infected with *Taenia solium*. **Journal of Helminthology**, v.73, n.4, p.363-365, 1999.

LARRALDE, C.; MONTOYA, R.M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T.; COLTORTI, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **American Journal for Tropical Medicine and Hygiene**, v.40, n.3, p.282-290, 1989.

MACEDO, H.W.; PERALTA, R.H.S.; CIPRIANO, A.; SARMENTO, M.R.; VAZ, A.J.; PERALTA, J.M. Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.2, p.93-103, 2002.

McFADDEN, A.M.J.; HEATH, D.D.; MORLEY, C.M.; DORNY, P. Investigation of an outbreak of *Taenia saginata* cysts (*Cysticercus bovis*) in dairy cattle from two farms. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.177-184, 2011.

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

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

MONTEIRO, L.L.; PINTO, P.S.A.; DIAS, F.S. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.260-263, 2006.

MONTEIRO, L.L.; PINTO, P.S.A.; SALCEDO, J.H.P.; ARAÚJO, J.V.; SANTOS, W.L.M.; CECON, P.R. Antígenos de larva de *Taenia solium* em ELISA para diagnóstico da cisticercose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.21-25, 2007.

MURREL, K.D. Epidemiology of taeniosis and cysticercosis. In: MURREL, K.D.; DORNY, P.; FLISSER, A.; GEERTS, S.; KYVSGAARD, N.C.; McMANUS, D.; NASH, T.; PAWLOWSKI, Z. **WHO/FAO/OIE Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis**. OIE, Paris, France, 2005. p.27-43.

OFFICE INTERNATIONALE DES EPIZOOTIES (OIE). Chapter 2.9.5, Cysticercosis. In: **OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. OIE, Sixth Edition, Paris, France, 2008. p.1216-1226.

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.; OLIVEIRA, J.A.C.; BATISTA, T.G.; OLIVEIRA, E.R.A.; NETO, C.C.C.; FILHO, A.F.E. 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.; HUGHES, G.; OPICHA, M.; NGINYI, K.M.; RUGUTT, M.K.; WRIGHT, S.H.; HARRISON, L.J.S. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. **Veterinary Parasitology**, v.61, p.221-230, 1996.

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

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

PAWLOWSKI, Z.; SCHULTZ, M.G. Taeniasis and cysticercosis, *Taenia saginata*. **Advances in Parasitology**, v.10, p.269-343, 1972.

PERALTA, R.H.; ESPÍNDOLA, N.M.; PARDINI, A.X.; IHA, A.H.; MOURA, H.; BARR, J.R.; VAZ, A.J.; PERALTA, J.M. *Taenia crassiceps* cysticerci: Characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Experimental Parasitology**, v.124, p.295-300, 2010.

PEREIRA, M.A.V.C.; SCHWANZ, V.S.; BARBOSA, C.G. Prevalência da cisticercose em carcaças de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos do estado do Rio de Janeiro, submetidos ao controle de Serviço de Inspeção Federal (SIF-RJ), no período de 1997 a 2003. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.83-87, 2006.

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

PINTO, P.S.A.; VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; GERMANO, P.M.L. Immunoblot analysis using antigen from *Taenia crassiceps* cysticerci in the diagnosis of swine cysticercosis. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.56, n.36-42, 2001.

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

REIS, D.O.; MUNDIM, M.J.S.; CABRAL, D.D.; COSTA-CRUZ, J.M. Cisticercose bovina: 15 anos de ocorrência em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil – 1979 a 1993. **Higiene Veterinária**, v.10, n.43, p.33-35, 1996.

REY, L. Tênia e teníases. In: REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008. p.516-529.

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

SANTOS, V.C.R.; RAMOS, E.T.G.; FILHO, F.S.A.; PINTO, J.M.S.; MUNHOZ, A.D. Prevalência da cisticercose em bovinos abatidos sob inspeção federal no município de Jequié, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.132-139, 2008.

SCANDRETT, B.; PARKER, S.; FORBES, L.; GAJADHAR, A.; DEKUMYOY, P.; WAIKAGUL, J.; HAINES, D. Distribution of *Taenia saginata* cysticerci in tissues of experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, v.164, p.223-231, 2009.

SCANDRETT, W.B.; HAINES, D.M.; PARKER, S.E.; ROBINSON, Y.; FORBES, L.B.; BRANDT, J.; GEERTS, S.; DORNY, P.; GAJADHAR, A.A. Validation of an immunohistochemical assay for bovine cysticercosis, with comparison to a standard histological method. **Veterinary Parasitology**, v.186, p.301-311, 2012.

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, R.M. A importância do serviço de inspeção federal na vigilância sanitária de alimentos – Cisticercose Bovina. **Higiene Alimentar**, v.11, n.48, p.19-21, 1997.

SOUZA, V.K.; PESSÔA-SILVA, M.C.; MINOZZO, J.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Prevalência da cisticercose bovina no estado do Paraná, sul do Brasil: avaliação de 26.465 bovinos inspecionados no SIF 1710. **Ciências Agrárias**, v.28, n.4, p.675-684, 2007.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, V.K.; PESSOA, O.L.; MINOZZO, J.C.; PESSOA-SILVA, M.C.; PEIXOTO, R.P.M.G.; MOURA, J.F. 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.

TSANG, V.C.W.; BRAND, J.A.; BOYER, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **The Journal of Infectious Diseases**, v.159, n.1, 1989.

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

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

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C.; GOLIM, M.A.; PAULAN, S.C.; BIONDI, G.F.; ROSSI-FERREIRA, R.; DEFFUNE, E.; NUNES, C.M. *Taenia saginata*: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens. **Experimental Parasitology**, v.126, p.621-625, 2010.

WHO. World Health Organization. **Training manual on diagnosis of intestinal parasites**. 1998.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar diferentes protocolos laboratoriais de dois métodos de imunodiagnóstico para a cisticercose bovina, ELISA indireto e imunoblot, e testar a aplicabilidade desses testes em animais naturalmente infectados.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento de seis diferentes preparações antigênicas de larva de *Taenia crassiceps* no teste ELISA frente a soros-controle positivos e negativos para a cisticercose e frente a soros-controle de bovinos com outras patologias;
- Caracterizar cada preparação antigênica através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- Avaliar diferentes diluições de conjugado e soros nos testes ELISA e imunoblot;
- Avaliar a eficiência de diferentes agentes bloqueadores no teste ELISA;
- Determinar a massa molecular e a importância diagnóstica de cada peptídeo pelo imunoblot.

CAPÍTULO 1

Avaliação de diferentes protocolos laboratoriais do ELISA para o imunodiagnóstico da cisticercose bovina utilizando antígenos de larva de *Taenia crassiceps*

RESUMO

Foram avaliados diferentes protocolos laboratoriais de ELISA para pesquisa de anticorpos na cisticercose bovina, utilizando soros-controle de bovinos positivos e negativos para a cisticercose. Foram estudados seis antígenos de *Taenia crassiceps*: total (T), total sonicado (Ts), total dialisado (Td), membrana (M), líquido vesicular (LV) e líquido vesicular sonicado (LVs). Na padronização do ELISA, foram analisadas as seguintes combinações através da titulação em bloco: diferentes concentrações dos antígenos, diluições seriadas dos soros e do conjugado e diferentes substâncias bloqueadoras. Definidos os melhores parâmetros, foi comparada a eficiência dos diferentes antígenos na diferenciação entre animais positivos e negativos para a cisticercose. As melhores concentrações de antígeno foram 10 µg/ml para os antígenos LV e LVs e 40 µg/ml para T, Ts, Td e M. A melhor diluição de soro foi 1:100 para todos os antígenos. As concentrações escolhidas de conjugado para serem utilizadas nas etapas seguintes de padronização foram 1:1.250 (T, Ts e M) e 1:2.500 (Td, LV e LVs). A melhor substância bloqueadora foi o leite em pó desnatado a 5%. Todos os antígenos testados mostraram poder de diagnóstico da cisticercose bovina, sendo que o antígeno M e T mostraram maior eficiência, seguido pelos antígenos Ts e Td. A combinação adequada dos diversos parâmetros testados contribuiu para ampliar a confiabilidade e aplicabilidade prática do teste ELISA em pesquisa e diagnóstico da cisticercose bovina, uma vez que facilita a diferenciação entre animais positivos e negativos.

Palavras-chave: Cisticercose bovina, ELISA, *Taenia crassiceps*, antígenos, padronização.

ABSTRACT

We evaluated different laboratory protocols of ELISA for research on antibodies in bovine cysticercosis, using control serum of positive and negative bovine for cysticercosis. We studied six antigens of *Taenia crassiceps*: total (T), total sonicated (Ts), total dialysate (Td), membrane (M), vesicular fluid (VF) and sonicated vesicular fluid (sVF). In the standardization of ELISA, we analyzed the following combinations through titrations: different concentrations of antigens, serial dilutions of sera and conjugate and different blocking substances. Having set the best parameters, we compared the efficiency of the various antigens in the distinction between positive and negative animals for cysticercosis. The best antigen concentrations were 10 µg/ml for VF and sVF antigens and 40 µg/ml for T, Ts, Td and M. The best serum dilution was 1:100 for all antigens. The chosen concentrations of conjugate for use in subsequent steps of patterning were 1:1,250 (T, Ts and M) and 1:2,500 (Td, VF and sVF). The best blocking substance was 5% skimmed milk powder. All tested antigens showed diagnostic power for bovine cysticercosis, having M and T antigens with greater efficiency, followed by Ts and Td antigens. The suitable combination of the various parameters tested contributed to increasing the reliability and practical applicability of the ELISA test in research and diagnosis of bovine cysticercosis, once it enables the distinction between positive and negative animals.

Keywords: Bovine cysticercosis, ELISA, *Taenia crassiceps*, antigens, standardization.

1. INTRODUÇÃO

O complexo teníase-cisticercose bovina, causado pela *Taenia saginata*, é responsável por problemas na saúde e produção animal e na saúde pública (Oryan et al., 1995). Trata-se de uma zoonose com distribuição cosmopolita, que possui o homem como hospedeiro definitivo e o bovino como hospedeiro intermediário (Onyango-Abuje et al., 1996; Pfuetzenreiter e Ávila-Pires, 2000).

No Brasil, a cisticercose bovina é considerada endêmica em diversos estados (Dutra et al., 2012) e a principal medida de controle adotada é o exame

anatomopatológico realizado durante a rotina de inspeção *post mortem* em Matadouros-Frigoríficos (Brasil, 1997).

Algumas tentativas têm sido feitas para a detecção da infecção em bovinos ainda vivos (Bøgh et al., 1996), uma vez que um ensaio sorológico confiável para a cisticercose bovina seria de grande valia para fiscais e agentes de inspeção sanitária que utilizam apenas métodos visuais para a vigilância de doenças (Hayunga et al., 1991; Draelants et al., 1995). Nessa perspectiva tem sido utilizado o teste ELISA no diagnóstico da cisticercose bovina.

Uma abordagem que vem sendo adotada na padronização desses testes sorológicos é o uso de antígenos heterólogos (Bøgh et al., 1996), devido à dificuldade de se obter antígeno de larva de *T. saginata*, aliada ao fato das espécies de *Taenia* compartilharem antígenos em comum (Bueno et al., 2000).

No ELISA, os antígenos de *T. saginata* e *T. crassiceps* apresentam desempenhos semelhantes no diagnóstico da cisticercose bovina, sendo que o último apresenta a vantagem de ser facilmente mantido em laboratório através da inoculação em camundongos, o que permite melhor padronização da qualidade destes antígenos (Geerts et al., 1981). Contudo, o aprimoramento dos protocolos dos testes existentes é necessário para um melhor desempenho e confiabilidade do mesmo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes protocolos laboratoriais do ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina, utilizando antígenos de larva de *Taenia crassiceps*, a fim de padronizar as condições que facilitem a diferenciação entre bovinos positivos e negativos para a cisticercose, contribuindo para a aplicação prática do teste.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Antígenos

Os antígenos de larva de *Taenia crassiceps* (Tcra) foram obtidos através da inoculação intraperitoneal em camundongos BALB/c fêmeas, de acordo com a metodologia descrita por Vaz et al. (1997). Foram analisadas seis diferentes preparações antigênicas de larva de Tcra, descritas a seguir.

2.1.1. Antígeno total (T)

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

2.1.2. Antígeno total sonicado (Ts)

O preparo do antígeno Ts consistiu das mesmas etapas do antígeno T (item 2.1.1) até o momento da homogeneização. Após esta etapa, o antígeno sofreu sonicação de acordo com a metodologia descrita por Minozzo et al. (2004), sendo quatro ciclos de sonicação, com uma frequência de 20 Khz e com amperagem de 1 mA durante 30 segundos e com intervalos também de 30 segundos. Em seguida, foi submetido à centrifugação a 17.400g/30min/4°C e ao sobrenadante foi adicionado o PMSF (0,25M – 10 µl/ml). O antígeno foi estocado a -20°C até o uso.

2.1.3. Antígeno total dialisado (Td)

Após realizar os procedimentos descritos no item 2.1.1, foi realizada a diálise de uma alíquota do antígeno T. O antígeno acondicionado numa membrana de diálise D6066-25EA de 21 mm de diâmetro com porosidade de 12.000 Da (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA) foi imerso em um litro de solução de PBS pH 7,4 por 24 horas sob agitação constante. Durante este período, realizaram-se três trocas de solução. O antígeno foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

2.1.4. Antígeno de membrana (M)

Os cisticercos coletados foram centrifugados a 35.000g/30min/4°C e, após o rompimento das vesículas, as membranas (sedimento) foram congeladas a -20°C e seguiram-se as etapas descritas no preparo do antígeno T (item 2.1.1).

2.1.5. Antígeno de líquido vesicular (LV)

Após a centrifugação a 35.000g/30min/4°C e do rompimento das vesículas, o sobrenadante foi separado e a ele foi adicionado o PMSF (0,25M – 10 µl/ml), constituindo-se o antígeno vesicular. O antígeno foi separado em alíquotas e armazenado a -20°C até o momento do uso.

2.1.6. Antígeno de líquido vesicular sonicado (LVs)

Para o preparo do antígeno LVs, foram realizadas as mesmas etapas do item 2.1.5, sendo que antes da adição do PMSF (0,25M – 10 µl/ml) foi realizada a sonicação do antígeno segundo metodologia descrita por Minozzo et al. (2004). O sobrenadante sofreu sonicação, de quatro ciclos, com uma frequência de 20 Khz e com amperagem de 1 mA durante 30 segundos e com intervalos também de 30 segundos.

2.1.7. Dosagem de proteína

Após o preparo dos antígenos, foi realizada a dosagem de proteína dos mesmos pelo método do ácido bicinconínico, através do kit Sigma BCA-1 (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA).

2.1.8. Caracterização dos antígenos (SDS-PAGE)

Os antígenos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em sistema descontínuo de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970) e Studier (1973). O gel de empilhamento foi preparado em concentração de 5% e o gel de separação em gradiente de concentração de 5 a 20% para a separação das bandas proteicas de acordo com a massa molecular.

Após a eletroforese, as bandas foram fixadas no gel por 30 minutos com metanol a 40% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) em água e, em seguida, o gel foi corado por 10 minutos a 56°C com Coomassie brilliant blue a 0,1%, metanol a 45% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) em água. O gel, então, foi descorado a 56°C em ácido acético a 7% (v/v) em água, sendo realizadas três trocas da solução a cada 10 minutos.

Juntamente com os antígenos, foi utilizado na corrida eletroforética o marcador de massa molecular S8445 de 6,5 a 200 kDa (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA), como referência para as bandas dos antígenos.

2.2. Soros-controle

De acordo com a capacidade da placa em função dos protocolos delineados, foram utilizados de dois a quatro soros-controle positivos de bovinos experimentalmente infectados com 120.000 ovos de *Taenia saginata* e dois a quatro negativos, de bovinos negativos para a cisticercose durante a rotina de inspeção *post mortem* realizada em Matadouros-Frigoríficos, seguindo rigorosamente as normas de inspeção de carnes (Brasil, 1971).

2.3. Padronização do ELISA

Em cada etapa da padronização foram comparadas, simultaneamente, duas variáveis do teste ELISA através da titulação em bloco, sendo estas: as concentrações dos diferentes antígenos, diluições do soro e conjugado e diferentes substâncias bloqueadoras. Além disso, todos os antígenos foram avaliados em uma mesma placa com o objetivo de evitar possíveis variações entre as análises.

Para o início dos ensaios de padronização, foram fixados os tempos de incubação (uma hora para as etapas de sensibilização e bloqueio, 30 minutos para a adição do soro e do conjugado, e cinco minutos para a revelação da reação), o agente bloqueador (leite em pó desnatado) e a diluição do conjugado (1:5.000) estabelecidos por Monteiro (2004).

Durante a primeira etapa foram avaliadas cinco concentrações de cada antígeno (2,5, 5, 10, 20 e 40 µg/ml) combinadas com diluições seriadas (1:2) dos soros-controle (entre 1:12,5 e 1:1.600), sendo usados dois soros-controle positivos e dois negativos.

Na segunda etapa, utilizando a melhor concentração estabelecida para cada antígeno, foi determinada a diluição ótima do conjugado. Para isso, foram comparadas diluições seriadas (1:2) do conjugado (1:312,5 a 1:40.000) com as quatro melhores diluições dos soros-controle (1:12,5 a 1:100), sendo usados três soros positivos e três negativos.

Na terceira etapa, foram avaliadas diferentes substâncias bloqueadoras: gelatina a 2%, soro albumina bovina (BSA) a 1%, caseína a 2% e leite em pó desnatado a 5%. Foram utilizados três soros-controle positivos e três negativos em diluição seriada (1:12,5 a 1:100).

A quarta e última etapa consistiu da comparação do desempenho entre as seis preparações antigênicas na diferenciação entre animais positivos e negativos para a cisticercose. O ensaio foi realizado nas melhores condições previamente definidas nas etapas anteriores (antígeno, conjugado e bloqueio), utilizando quatro soros-controle positivos e quatro negativos, nas duas melhores diluições encontradas nas etapas anteriores, 1:50 e 1:100.

2.4. Análise dos resultados

2.4.1. Identificação das bandas dos antígenos

As bandas dos antígenos foram caracterizadas pelo programa Quantity One, versão 4.6 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), a partir da identificação das bandas do marcador de massa molecular.

2.4.2. ELISA

Os resultados das reações obtidas pelo teste ELISA na avaliação das diferentes variáveis foram analisados com base nas amplitudes das diferenças de densidades ópticas (D.O.) observadas entre as reações com os soros-controle positivos e as reações com os negativos, sendo selecionados aqueles resultados que apresentaram maior amplitude nesta diferença. Os dados foram processados e analisados estatisticamente pelo programa estatístico SAEG 9.0. Esses dados foram submetidos aos testes de Lilliefors e de Cochran e Bartlett para verificar se os mesmos atendiam as premissas de normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Os dados que atenderam a estas premissas foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias pelos testes Tukey com 5% de significância. Já as que não atenderam as premissas, foram submetidas à análise de variância não paramétrica e a comparação múltipla das médias, pelo teste Kruskal-Wallis com 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SDS-PAGE

A Figura 1 e a Tabela 1 mostram os perfis de cada um dos antígenos estudados, de acordo com a massa molecular dos peptídeos separados por eletroforese (SDS-PAGE).

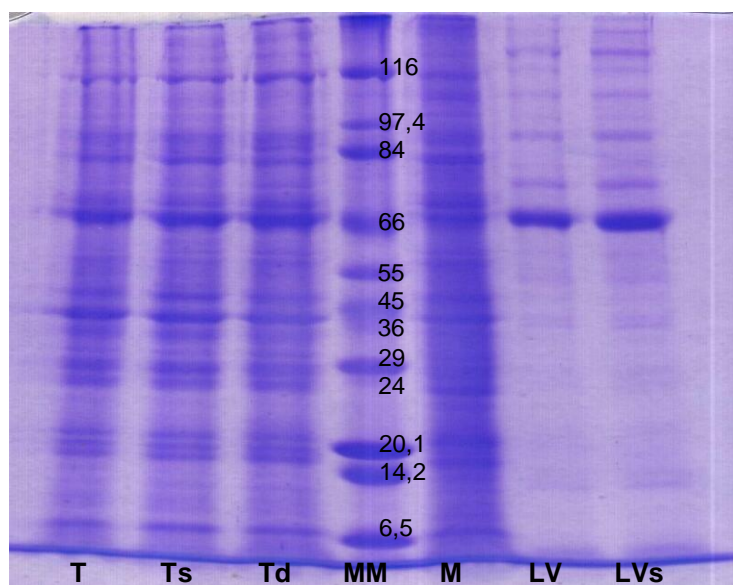


Figura 1. Perfil dos peptídeos dos antígenos total (T), total sonificado (Ts), total dialisado (Td), membrana (M), líquido vesicular (LV) e líquido vesicular sonificado (LVs) de larva de *Taenia crassiceps*, acompanhados do marcador de massa molecular (MM).

Os antígenos apresentaram um grande número e variedade de peptídeos, entre 5,3 a 159,5 kDa. Foram identificados e quantificados 26 peptídeos no antígeno T, 27 no antígeno Ts, 24 nos antígenos Td e M e 17 nos antígenos LV e LVs.

Apesar da diferença encontrada entre os perfis dos antígenos, alguns peptídeos foram identificados em todas as seis preparações antigênicas de larva de *T. crassiceps*: 33-34, 38-39, 43-47, 48-49, 55-56 e 63-65 kDa (Tabela 1). Entre estes peptídeos, os de 43, 55 e 65 kDa são considerados específicos para a cisticercose bovina por outros autores, uma vez que anticorpos monoclonais contra antígenos de *T. saginata* reconheceram estes componentes antigênicos (Brandt et al., 1992; Vicentini-Oliveira et al., 2010). Sendo assim, os outros peptídeos deste grupo também podem apresentar potencial diagnóstico para a cisticercose bovina.

Enquanto os antígenos T, Ts, Td e M possuem vários peptídeos de baixa massa molecular, os antígenos LV e LVs apresentaram menor número destes peptídeos, o que também foi observado por Monteiro (2004). Isto pode ser uma desvantagem no uso destes antígenos em relação aos demais, já que estas bandas de baixa massa molecular são consideradas mais específicas, com maior potencial diagnóstico, para a cisticercose bovina (Giroto et al., 2009). Os processos de sonicação e diálise dos antígenos não causaram mudanças significativas nos perfis de peptídeos dos mesmos. Sendo assim, estes processos podem ser dispensáveis, uma vez que requerem equipamentos e materiais específicos, aumentando o custo e tempo de produção.

Tabela 1. Caracterização dos antígenos total (T), total sonificado (Ts), total dialisado (Td), membrana (M), líquido vesicular (LV) e líquido vesicular sonificado (LVs) de *Taenia crassiceps* de acordo com os peptídeos separados por SDS-PAGE.

Ordem de identificação dos peptídeos	Peptídeos de acordo com a massa molecular (kDa)	Antígenos					
		T	Ts	Td	M	LV	LVs
1	159,5	-	-	-	-	-	X
2	157	-	X	X	-	X	-
3	152	X	-	-	-	-	-
4	150-151	-	X	-	-	-	-
5	136-137	-	-	X	-	X	X
6	134-135	-	X	-	X	-	-
7	133	X	-	-	-	-	-
8	118-119	-	-	-	-	X	X
9	114-115	X	X	X	X	-	-
10	99-100	X	-	-	-	-	-
11	96-98	-	X	-	X	X	X
12	94	-	X	-	-	-	-
13	92	X	-	-	-	-	-
14	89	-	-	-	X	-	-
15	86-88	X	X	-	-	X	X
16	78	-	-	-	X	-	-
17	76	-	-	-	-	-	X
18	73-75	X	X	X	X	X	-
19	69-70	-	-	X	-	-	-
20	63-65	X	X	X	X	X	X
21	60-61	-	-	-	-	X	X
22	57-58	X	X	X	X	-	-
23	55-56	X	X	X	X	X	X
24	48-49	X	X	X	X	X	X
25	43-47	X	X	X	X	X	X
26	38-39	X	X	X	X	X	X
27	33-34	X	X	X	X	X	XX
28	32	X	X	X	-	X	-
29	29-30	X	X	X	X	-	-
30	25-27	X	X	X	X	-	-
31	23	X	X	X	X	-	-
32	22	X	X	X	X	-	-
33	20-21	X	X	X	X	-	-
34	19	X	X	X	X	-	-
35	16-17	X	X	X	X	-	-
36	13-14	-	-	-	-	X	X
37	12	-	-	-	-	X	X
38	11	X	X	X	X	-	-
39	8-10	XX	XX	XX	XX	-	-
40	6-7	X	X	X	X	-	-
41	5,3-5,5	-	-	-	-	X	X
Total	-	26	27	24	24	17	17

X: presença do peptídeo
 -: ausência do peptídeo

3.2. Padronização do ELISA

3.2.1. Concentração de antígenos e diluição de soros

As quatro diluições dos soros-controle que apresentaram melhores resultados nesta etapa ao diferenciar bovinos positivos e negativos para a cisticercose e, portanto, escolhidas para serem utilizadas nas etapas posteriores foram 1:12,5, 1:25, 1:50 e 1:100 (Tabelas 2 a 7). Logo, somente os resultados dessas diluições foram considerados para avaliar a concentração ótima de cada antígeno.

Quando se observa as diluições de 1:200 a 1:1.600 percebe-se uma diminuição nas amplitudes das diferenças das D.O. entre os soros-controle positivos e negativos, resultando em um menor desempenho na diferenciação destes animais, o que desfavorece o uso do teste. Monteiro (2004) ao testar diluições seriadas de 1:25 a 1:3.200, também verificou uma queda no desempenho em diluições superiores a 1:200, não considerando estes dados nos resultados.

Pode ser observado também, que para a diluição de soro 1:12,5 a concentração do antígeno não interferiu no desempenho do teste, podendo ser usadas concentrações menores ou maiores obtendo o mesmo resultado. Este resultado só não foi observado para o antígeno Ts (Tabela 3) e para o antígeno M (Tabela 5), onde foram encontradas diferenças estatísticas entre as concentrações dos antígenos nesta diluição.

Para o antígeno T, apenas as concentrações de 20 e 40 µg/ml do antígeno apresentaram desempenho superior nas quatro diluições dos soros-controle escolhidas, sendo que a concentração de 10 µg/ml foi inferior a estas somente na diluição 1:100. Apesar do desempenho semelhante, a concentração escolhida foi de 40 µg/ml, uma vez que apresentou diferença estatística em relação à de 10 µg/ml, enquanto a de 20 µg/ml foi estatisticamente semelhante (Tabela 2).

Monteiro et al. (2008) encontraram os melhores desempenhos com as concentrações de 10, 20 e 40 µg/ml para o antígeno total de larva de *T. crassiceps*, sendo que a concentração de 40 µg/ml, apesar de ser estatisticamente semelhante a estas outras duas, diferiu estatisticamente de concentrações inferiores, enquanto as demais não, concordando com os resultados obtidos neste trabalho. Já Minozzo et al. (2004) observaram que a

reatividade do ELISA aumentou até a concentração de 3 µg/ml de antígeno total, sendo a intensidade da reação (D.O.) proporcional à quantidade de antígeno utilizada no teste.

Tabela 2. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno total (T) de *Taenia crassiceps*.

Diluição dos soros-controle	Concentração do antígeno (µg/ml)				
	2,5 ⁽¹⁾	5 ⁽²⁾	10 ⁽²⁾	20 ⁽¹⁾	40 ⁽¹⁾
1:12,5 ⁽¹⁾	0,192 ^{a,A}	0,216 ^{a,A}	0,230 ^{a,b,A}	0,242 ^{a,b,A}	0,254 ^{a,A}
1:25 ⁽¹⁾	0,177 ^{a,b,C}	0,212 ^{a,b,B,C}	0,245 ^{a,A,B}	0,268 ^{a,A}	0,280 ^{a,A}
1:50 ⁽¹⁾	0,163 ^{a,b,C}	0,216 ^{a,B,C}	0,249 ^{a,A,B}	0,270 ^{a,A,B}	0,289 ^{a,A}
1:100 ⁽¹⁾	0,142 ^{b,c,D}	0,199 ^{a,b,C}	0,231 ^{a,b,B,C}	0,257 ^{a,A,B}	0,273 ^{a,A}
1:200 ⁽¹⁾	0,106 ^{c,d,B}	0,213 ^{a,b,A}	0,223 ^{a,b,A}	0,234 ^{a,b,A}	0,256 ^{a,A}
1:400 ⁽¹⁾	0,111 ^{c,d,C}	0,160 ^{a,b,B}	0,175 ^{a,b,A,B}	0,189 ^{b,A}	0,196 ^{b,A}
1:800 ⁽¹⁾	0,075 ^{d,e,C}	0,108 ^{a,b,B}	0,126 ^{a,b,A,B}	0,129 ^{c,A,B}	0,141 ^{c,A}
1:1.600 ⁽¹⁾	0,052 ^{e,C}	0,064 ^{b,B,C}	0,072 ^{b,A,B}	0,078 ^{c,A,B}	0,085 ^{d,A}

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

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

Para o antígeno Ts, a concentração que apresentou alto desempenho nas quatro diluições dos soros foi a de 40 µg/ml. Apesar de ser semelhante às concentrações de 10 e 20 µg/ml nas diluições de 1:12,5 a 1:50, na diluição 1:100 o seu resultado foi superior às demais (Tabela 3), sendo por este motivo escolhida para ser utilizada nas próximas etapas de padronização.

Tabela 3. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno total sonicado (Ts) de *Taenia crassiceps*.

Diluição dos soros-controle	Concentração do antígeno (µg/ml)				
	2,5 ⁽¹⁾	5 ⁽¹⁾	10 ⁽¹⁾	20 ⁽²⁾	40 ⁽²⁾
1:12,5 ⁽¹⁾	0,159 ^{a,C}	0,201 ^{a,B,C}	0,248 ^{a,A,B}	0,260 ^{a,A}	0,267 ^{a,A}
1:25 ⁽¹⁾	0,141 ^{a,B}	0,162 ^{b,B}	0,228 ^{a,b,A}	0,240 ^{a,A}	0,259 ^{a,A}
1:50 ⁽¹⁾	0,118 ^{a,b,B}	0,130 ^{b,B}	0,194 ^{b,A}	0,209 ^{a,b,A}	0,227 ^{a,b,A}
1:100 ⁽¹⁾	0,091 ^{b,C}	0,091 ^{c,C}	0,148 ^{c,B}	0,161 ^{a,b,c,B}	0,199 ^{a,b,c,A}
1:200 ⁽²⁾	0,062 ^{c,B}	0,066 ^{d,A,B}	0,117 ^{d,A,B}	0,120 ^{a,b,c,A,B}	0,129 ^{a,b,c,A}
1:400 ⁽¹⁾	0,050 ^{c,B}	0,050 ^{d,B}	0,086 ^{e,A}	0,087 ^{a,b,c,A}	0,093 ^{a,b,c,A}
1:800 ⁽²⁾	0,034 ^{d,B}	0,036 ^{e,B}	0,054 ^{f,A,B}	0,059 ^{b,c,A,B}	0,072 ^{b,c,A}
1:1.600 ⁽¹⁾	0,025 ^{d,C}	0,024 ^{f,C}	0,033 ^{g,B}	0,028 ^{c,B,C}	0,044 ^{c,A}

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

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

A concentração escolhida para o antígeno Td também foi a de 40 µg/ml, que apresentou resultados semelhantes às demais concentrações na diluição de 1:12,5, semelhantes as concentrações de 10 e 20 µg/ml na diluição de 1:25 e semelhante a de 20 µg/ml nas diluições de 1:50 e 1:100. No entanto, na diluição de 1:50, a concentração de 40 µg/ml apresentou diferença estatística da concentração de 10 µg/ml, enquanto a de 20 µg/ml foi semelhante a esta (Tabela 4), sendo, por este motivo, escolhida a concentração de 40 µg/ml.

Tabela 4. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno total dialisado (Td) de *Taenia crassiceps*.

Diluição dos soros-controle	Concentração do antígeno ($\mu\text{g/ml}$)				
	2,5 ⁽¹⁾	5 ⁽¹⁾	10 ⁽²⁾	20 ⁽²⁾	40 ⁽²⁾
1:12,5 ⁽²⁾	0,200 ^{a,b,A}	0,224 ^{a,A}	0,243 ^{a,b,A}	0,242 ^{a,b,A}	0,231 ^{c,d,A}
1:25 ⁽²⁾	0,208 ^{a,B}	0,217 ^{a,B}	0,249 ^{a,A,B}	0,263 ^{a,b,A}	0,265 ^{b,c,A}
1:50 ⁽²⁾	0,200 ^{a,b,D}	0,215 ^{a,C,D}	0,249 ^{a,B,C}	0,273 ^{a,b,A,B}	0,295 ^{a,b,A}
1:100 ⁽²⁾	0,171 ^{a,b,c,D}	0,204 ^{a,b,C}	0,244 ^{a,b,B}	0,281 ^{a,A}	0,303 ^{a,A}
1:200 ⁽²⁾	0,148 ^{a,b,c,C}	0,160 ^{a,b,C}	0,206 ^{b,B}	0,234 ^{b,A,B}	0,259 ^{b,c,A}
1:400 ⁽²⁾	0,101 ^{a,b,c,D}	0,131 ^{a,b,C}	0,155 ^{c,B,C}	0,174 ^{c,B}	0,201 ^{d,A}
1:800 ⁽²⁾	0,069 ^{b,c,D}	0,085 ^{a,b,C,D}	0,105 ^{d,B,C}	0,123 ^{d,A,B}	0,142 ^{e,A}
1:1.600 ⁽²⁾	0,039 ^{c,D}	0,049 ^{b,C,D}	0,062 ^{e,B,C}	0,073 ^{e,A,B}	0,083 ^{f,A}

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

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

Para o antígeno M, a concentração escolhida foi 40 $\mu\text{g/ml}$. Apesar de apresentar desempenho semelhante em relação às concentrações de 5, 10 e 20 nas diluições de soros de 1:12,5, 1:25 e 1:100, o seu desempenho foi estatisticamente superior na diluição 1:50, o que fez com que fosse adotada nas próximas etapas de padronização do teste (Tabela 5).

Tabela 5. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno de membrana (M) de *Taenia crassiceps*.

Diluição dos soros-controle	Concentração do antígeno ($\mu\text{g/ml}$)				
	2,5 ⁽¹⁾	5 ⁽¹⁾	10 ⁽¹⁾	20 ⁽¹⁾	40 ⁽¹⁾
1:12,5 ⁽²⁾	0,214 ^{a,B}	0,226 ^{a,A,B}	0,240 ^{a,b,A,B}	0,250 ^{a,b,A,B}	0,264 ^{a,b,A}
1:25 ⁽¹⁾	0,189 ^{a,b,B}	0,247 ^{a,A,B}	0,246 ^{a,A,B}	0,267 ^{a,A}	0,284 ^{a,A}
1:50 ⁽²⁾	0,165 ^{a,b,c,C}	0,234 ^{a,b,B}	0,219 ^{a,b,c,B}	0,248 ^{a,b,B}	0,284 ^{a,A}
1:100 ⁽¹⁾	0,168 ^{a,b,c,B}	0,187 ^{a,b,c,A,B}	0,181 ^{a,b,c,B}	0,226 ^{a,b,c,A,B}	0,284 ^{a,A}
1:200 ⁽¹⁾	0,088 ^{b,c,B}	0,199 ^{a,b,c,B}	0,227 ^{a,b,A,B}	0,230 ^{a,b,c,A,B}	0,270 ^{a,b,A}
1:400 ⁽¹⁾	0,114 ^{a,b,c,B}	0,184 ^{a,b,c,A,B}	0,153 ^{a,b,c,B}	0,167 ^{a,b,c,A,B}	0,205 ^{a,b,A}
1:800 ⁽¹⁾	0,074 ^{b,c,B}	0,120 ^{b,c,A,B}	0,104 ^{b,c,A,B}	0,100 ^{b,c,B}	0,142 ^{a,b,A}
1:1.600 ⁽²⁾	0,044 ^{c,C}	0,059 ^{c,B,C}	0,058 ^{c,B,C}	0,067 ^{c,A,B}	0,081 ^{b,A}

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

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

Houve pouca variação de desempenho entre as concentrações do antígeno LV em cada diluição de soro-controle. No entanto, na diluição 1:25 a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ apresentou resultado estatisticamente superior a concentração de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, enquanto as demais foram semelhantes, sendo, portanto, a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ escolhida como a concentração ótima deste antígeno (Tabela 6).

Tabela 6. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno de líquido vesicular (LV) de *Taenia crassiceps*.

Diluição dos soros-controle	Concentração do antígeno (µg/ml)				
	2,5 ⁽¹⁾	5 ⁽¹⁾	10 ⁽¹⁾	20 ⁽¹⁾	40 ⁽¹⁾
1:12,5 ⁽¹⁾	0,182 ^{a,A}	0,229 ^{a,A}	0,215 ^{a,A}	0,220 ^{a,A}	0,222 ^{a,A}
1:25 ⁽¹⁾	0,142 ^{b,B}	0,193 ^{a,b,A,B}	0,219 ^{a,A}	0,209 ^{a,A,B}	0,213 ^{a,A,B}
1:50 ⁽¹⁾	0,111 ^{c,B}	0,167 ^{b,A}	0,171 ^{a,b,A}	0,181 ^{a,b,A}	0,185 ^{a,A}
1:100 ⁽¹⁾	0,084 ^{c,d,A}	0,125 ^{c,A}	0,138 ^{b,c,A}	0,140 ^{b,A}	0,131 ^{b,A}
1:200 ⁽¹⁾	0,079 ^{d,C}	0,110 ^{c,B,C}	0,123 ^{c,A,B}	0,145 ^{b,A}	0,127 ^{b,A,B}
1:400 ⁽¹⁾	0,043 ^{e,C}	0,073 ^{d,B}	0,088 ^{d,A,B}	0,100 ^{c,A}	0,102 ^{b,A}
1:800 ⁽¹⁾	0,032 ^{e,f,C}	0,051 ^{e,B}	0,054 ^{e,B}	0,069 ^{d,A}	0,060 ^{c,A,B}
1:1.600 ⁽¹⁾	0,008 ^{f,D}	0,024 ^{f,C}	0,018 ^{f,B,C}	0,034 ^{e,A,B}	0,030 ^{c,A}

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

Assim como para o antígeno LV, as concentrações do antígeno LVs apresentaram poucas variações nos desempenhos. Contudo na diluição 1:25, apenas as concentrações de 10, 20 e 40 µg/ml apresentaram desempenho superior, sendo escolhida a concentração de 10 µg/ml com o objetivo de economizar o reagente, uma vez que seu desempenho foi estatisticamente semelhante ao de concentrações maiores (Tabela 7).

Tabela 7. Médias das diferenças das amplitudes das densidades ópticas obtidas das reações entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diferentes concentrações de antígeno e diluições dos soros para o antígeno de líquido vesicular sonicado (LVs) de *Taenia crassiceps*.

Diluição dos soros-controle	Concentração do antígeno (µg/ml)				
	2,5 ⁽¹⁾	5 ⁽¹⁾	10 ⁽¹⁾	20 ⁽¹⁾	40 ⁽¹⁾
1:12,5 ⁽¹⁾	0,157 ^{a,A}	0,178 ^{a,A}	0,191 ^{a,A}	0,196 ^{a,A}	0,205 ^{a,A}
1:25 ⁽¹⁾	0,134 ^{a,b,C}	0,154 ^{a,B,C}	0,212 ^{a,A}	0,188 ^{a,A,B}	0,195 ^{a,A,B}
1:50 ⁽¹⁾	0,113 ^{b,c,A}	0,143 ^{a,A}	0,151 ^{b,A}	0,156 ^{a,b,A}	0,157 ^{a,b,A}
1:100 ⁽¹⁾	0,091 ^{c,d,B}	0,110 ^{b,A,B}	0,142 ^{b,c,A}	0,130 ^{b,A}	0,145 ^{b,A}
1:200 ⁽¹⁾	0,070 ^{d,C}	0,100 ^{b,B,C}	0,120 ^{c,A,B}	0,133 ^{b,A,B}	0,143 ^{b,A}
1:400 ⁽¹⁾	0,052 ^{e,C}	0,076 ^{c,B}	0,090 ^{d,A,B}	0,094 ^{c,A,B}	0,105 ^{c,A}
1:800 ⁽¹⁾	0,031 ^{f,C}	0,053 ^{d,B}	0,055 ^{e,B}	0,070 ^{c,A}	0,074 ^{d,A}
1:1.600 ⁽¹⁾	0,034 ^{f,A}	0,028 ^{e,A}	0,030 ^{f,A}	0,038 ^{d,A}	0,040 ^{e,A}

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

Outras concentrações de antígenos usadas em diferentes protocolos de ELISA para o diagnóstico de anticorpos na cisticercose bovina são 1 µg/ml (Ogunremi e Benjamin, 2010), 5 µg/ml (Onyango-Abuje et al., 1996; Ferrer et al., 2003) para antígenos de larva de *T. saginata* e 1 µg/ml (Thomaz-Soccol et al., 2010) para antígeno de larva de *T. crassiceps*.

3.2.2. Diluição de conjugado

O critério utilizado para a escolha da diluição ótima do conjugado foi baseado em cada diluição dos soros-controle, sendo escolhida aquela que apresentou melhor desempenho nas diferentes condições.

Observando as tabelas dos antígenos T, Ts, Td e M (Tabelas 8 a 11), nota-se uma tendência inversamente proporcional entre as diluições dos soros-controle e as diluições do conjugado. Para as menores diluições do conjugado, as maiores diluições dos soros apresentaram resultados superiores; enquanto para as maiores diluições dos conjugados, os melhores resultados foram apresentados pelas menores diluições dos soros. Já para os antígenos LV e LVs (Tabelas 12 e 13), as menores diluições de conjugado também apresentaram melhor desempenho nas maiores diluições de soros, porém, as

diluições de soros não influenciaram no desempenho das maiores diluições do conjugado.

Para o antígeno T, as diluições de conjugado que apresentaram melhor desempenho em todas as diluições dos soros-controle foram de 1:312,5 a 1:5.000. Contudo, a diluição 1:1.250 apresentou maior valor absoluto de amplitude das diferença de densidade óptica na metade das diluições dos soros e, ainda, nas diluições de soros de 1:50 e 1:100, esta foi estatisticamente superior a diluição de 1:10.000, enquanto as diluições de 1:2.500 e 1:5.000 foram semelhantes (Tabela 8). Sendo assim, optou-se pela diluição de conjugado de 1:1.250 para a padronização das próximas etapas.

Monteiro et al. (2008) encontraram resultado semelhante na padronização do ELISA utilizando o antígeno total de larva de *T. crassiceps*, destacando as diluições de 1:1.250, 1:2.500 e 1:5.000 entre as que apresentaram melhor desempenho em diferenciar soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina.

Tabela 8. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno total (T) de *Taenia crassiceps*.

Diluição do conjugado	Diluição dos soros-controle			
	1:12,5 ⁽¹⁾	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾
1:312,5 ⁽²⁾	0,129 ^{a,b,c,D}	0,186 ^{a,b,C}	0,248 ^{a,b,B}	0,289 ^{a,A}
1:625 ⁽¹⁾	0,186 ^{a,b,B}	0,250 ^{a,A,B}	0,281 ^{a,A}	0,303 ^{a,A}
1:1.250 ⁽²⁾	0,233 ^{a,A}	0,272 ^{a,A}	0,284 ^{a,A}	0,276 ^{a,A}
1:2.500 ⁽²⁾	0,253 ^{a,A}	0,263 ^{a,A}	0,242 ^{a,b,A}	0,212 ^{a,b,A}
1:5.000 ⁽²⁾	0,261 ^{a,A}	0,241 ^{a,A}	0,193 ^{a,b,c,B}	0,166 ^{a,b,c,B}
1:10.000 ⁽²⁾	0,171 ^{a,b,A}	0,159 ^{a,b,A,B}	0,138 ^{b,c,B}	0,106 ^{b,c,C}
1:20.000 ⁽²⁾	0,099 ^{b,c,A}	0,078 ^{b,B}	0,074 ^{c,B}	0,058 ^{b,c,C}
1:40.000 ⁽²⁾	0,050 ^{c,A}	0,043 ^{b,A,B}	0,040 ^{c,B}	0,032 ^{c,C}

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

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

Para o antígeno Ts, as diluições que apresentaram desempenho superiores as demais, em todas as diluições de soros, foram as de 1:625 a 1:5.000. No entanto, foi escolhida a diluição de 1:1.250 pelo fato de esta ser a maior diluição estatisticamente superior a diluição de 1:10.000, uma vez que as

diluições 1:2.500 e 1:5.000 são semelhantes a esta, apesar de serem semelhantes a diluição de 1:1.250 (Tabela 9).

Tabela 9. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno total sonicado (Ts) de *Taenia crassiceps*.

Diluição do conjugado	Diluição dos soros-controle			
	1:12,5 ⁽¹⁾	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾
1:312,5 ⁽²⁾	0,129 ^{b,c,d,C}	0,194 ^{a,b,c,B}	0,237 ^{a,b,A}	0,259 ^{a,A}
1:625 ⁽²⁾	0,196 ^{a,b,c,B}	0,240 ^{a,b,A}	0,266 ^{a,A}	0,269 ^{a,A}
1:1.250 ⁽²⁾	0,251 ^{a,b,A}	0,273 ^{a,A}	0,271 ^{a,A}	0,249 ^{a,A}
1:2.500 ⁽²⁾	0,275 ^{a,A}	0,249 ^{a,A}	0,233 ^{a,b,A,B}	0,189 ^{a,b,B}
1:5.000 ⁽²⁾	0,238 ^{a,b,A}	0,207 ^{a,b,c,A,B}	0,178 ^{a,b,c,B,C}	0,153 ^{a,b,c,C}
1:10.000 ⁽²⁾	0,147 ^{a,b,c,d,A}	0,141 ^{b,c,d,A}	0,113 ^{b,c,B}	0,094 ^{b,c,C}
1:20.000 ⁽²⁾	0,081 ^{c,d,A}	0,076 ^{c,d,A}	0,060 ^{c,B}	0,053 ^{b,c,B}
1:40.000 ⁽²⁾	0,050 ^{d,A}	0,043 ^{d,A}	0,031 ^{c,B}	0,029 ^{c,B}

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

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

Já para o antígeno Td, a diluição escolhida para ser utilizada nas próximas etapas foi a de 1:2.500. Diante das diferentes diluições dos soros, as diluições do conjugado de 1:1.250 a 1:5.000 apresentaram os melhores desempenhos, sendo que a diluição de 1:2.500 é a maior que difere estatisticamente da diluição de 1:10.000 (Tabela 10).

Tabela 10. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno total dialisado (Td) de *Taenia crassiceps*.

Diluição do conjugado	Diluição dos soros-controle			
	1:12,5 ⁽¹⁾	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾
1:312,5 ⁽¹⁾	0,037 ^{c,C}	0,110 ^{c,d,B,C}	0,203 ^{c,d,A,B}	0,278 ^{b,c,d,e,A}
1:625 ⁽²⁾	0,100 ^{b,c,D}	0,190 ^{b,c,d,C}	0,274 ^{a,b,c,B}	0,343 ^{a,b,c,A}
1:1.250 ⁽¹⁾	0,173 ^{a,b,C}	0,261 ^{a,b,B,C}	0,329 ^{a,b,A,B}	0,373 ^{a,A}
1:2.500 ⁽²⁾	0,242 ^{a,C}	0,307 ^{a,B}	0,335 ^{a,A}	0,352 ^{a,b,A}
1:5.000 ⁽²⁾	0,271 ^{a,B}	0,300 ^{a,A,B}	0,321 ^{a,b,A}	0,320 ^{a,b,c,d,A}
1:10.000 ⁽²⁾	0,230 ^{a,A}	0,232 ^{a,b,c,A}	0,221 ^{b,c,d,A,B}	0,211 ^{c,d,e,B}
1:20.000 ⁽²⁾	0,144 ^{a,b,c,A}	0,134 ^{b,c,d,A,B}	0,123 ^{c,d,B}	0,120 ^{d,e,B}
1:40.000 ⁽²⁾	0,079 ^{b,c,A}	0,077 ^{d,A}	0,079 ^{d,A}	0,061 ^{e,B}

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

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

Para o antígeno M, as diluições que apresentaram os melhores desempenhos foram de 1:312,5 a 1:2.500, sendo que a diluição de 1:1.250 foi escolhida por ser a maior diluição entre as citadas a apresentar diferença estatística das demais (Tabela 11).

Tabela 11. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno de membrana (M) de *Taenia crassiceps*.

Diluição do conjugado	Diluição dos soros-controle			
	1:12,5 ⁽¹⁾	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾
1:312,5 ⁽²⁾	0,176 ^{a,b,c,C}	0,254 ^{a,b,B}	0,306 ^{a,A}	0,309 ^{a,A}
1:625 ⁽¹⁾	0,245 ^{a,A}	0,298 ^{a,A}	0,298 ^{a,A}	0,279 ^{a,b,A}
1:1.250 ⁽²⁾	0,251 ^{a,A}	0,287 ^{a,A}	0,282 ^{a,A}	0,246 ^{a,b,c,A}
1:2.500 ⁽²⁾	0,245 ^{a,A}	0,248 ^{a,b,A}	0,220 ^{a,b,A,B}	0,186 ^{a,b,c,d,B}
1:5.000 ⁽²⁾	0,222 ^{a,b,A}	0,215 ^{a,b,c,A}	0,190 ^{a,b,c,A}	0,153 ^{b,c,d,e,B}
1:10.000 ⁽²⁾	0,146 ^{a,b,c,A}	0,132 ^{b,c,d,A,B}	0,113 ^{b,c,B}	0,090 ^{c,d,e,C}
1:20.000 ⁽²⁾	0,077 ^{b,c,A}	0,069 ^{c,d,A,B}	0,063 ^{b,c,B}	0,048 ^{d,e,C}
1:40.000 ⁽²⁾	0,043 ^{c,A}	0,038 ^{d,A}	0,033 ^{c,A}	0,032 ^{e,A}

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

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

Para o antígeno LV, as diluições que apresentaram os melhores desempenhos nas diferentes diluições de soros foram as de 1:1.250 e 1:2.500. Por apresentarem resultados semelhantes, foi escolhida a diluição de 1:2.500 com o objetivo de economizar o reagente no teste, uma vez que isto não irá interferir no seu desempenho (Tabela 12). O mesmo resultado foi obtido por Monteiro et al. (2008) que, ao padronizarem o teste ELISA usando este antígeno, também obtiveram a diluição ótima de 1:2.500 para o conjugado.

Tabela 12. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno de líquido vesicular (LV) de *Taenia crassiceps*.

Diluição do conjugado	Diluição dos soros-controle			
	1:12,5 ⁽¹⁾	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽²⁾	1:100 ⁽¹⁾
1:312,5 ⁽²⁾	0,034 ^{c,C}	0,091 ^{b,c,D}	0,142 ^{c,B}	0,203 ^{a,b,A}
1:625 ⁽²⁾	0,100 ^{b,c,C}	0,168 ^{a,b,B}	0,203 ^{b,A,B}	0,244 ^{a,A}
1:1.250 ⁽²⁾	0,168 ^{a,b,B}	0,211 ^{a,A,B}	0,244 ^{a,A}	0,248 ^{a,A}
1:2.500 ⁽²⁾	0,219 ^{a,A}	0,232 ^{a,A}	0,242 ^{a,A}	0,226 ^{a,b,A}
1:5.000 ⁽²⁾	0,199 ^{a,b,A}	0,197 ^{a,A}	0,195 ^{b,A}	0,169 ^{a,b,c,A}
1:10.000 ⁽²⁾	0,145 ^{a,b,A}	0,144 ^{a,b,A}	0,129 ^{c,A}	0,114 ^{b,c,A}
1:20.000 ⁽²⁾	0,085 ^{b,c,A}	0,079 ^{b,c,A}	0,073 ^{d,A}	0,062 ^{c,A}
1:40.000 ⁽¹⁾	0,059 ^{c,A}	0,044 ^{c,A}	0,053 ^{d,A}	0,047 ^{c,A}

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

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

Já para o antígeno LVs, as diluições de conjugado que apresentaram maior desempenho foram as de 1:625 a 1:10.000. No entanto, a diluição 1:2.500 foi escolhida pelo fato de ser a maior diluição a se diferenciar estatisticamente das diluições acima de 1:10.000, enquanto as demais mostraram semelhança nos seus resultados (Tabela 13).

Tabela 13. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com as diluições dos conjugados e diluições dos soros para o antígeno de líquido vesicular sonicado (LVs) de *Taenia crassiceps*.

Diluição do conjugado	Diluição dos soros-controle			
	1:12,5 ⁽¹⁾	1:25 ⁽¹⁾	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽¹⁾
1:312,5 ⁽²⁾	0,037 ^{b,C}	0,075 ^{b,c,C}	0,129 ^{a,b,c,B}	0,192 ^{a,b,A}
1:625 ⁽²⁾	0,088 ^{a,b,C}	0,132 ^{a,b,c,B,C}	0,175 ^{a,b,A,B}	0,228 ^{a,A}
1:1.250 ⁽²⁾	0,149 ^{a,b,A}	0,186 ^{a,b,A}	0,205 ^{a,A}	0,238 ^{a,A}
1:2.500 ⁽²⁾	0,179 ^{a,A}	0,208 ^{a,A}	0,296 ^{a,A}	0,218 ^{a,A}
1:5.000 ⁽²⁾	0,192 ^{a,A}	0,188 ^{a,b,A}	0,185 ^{a,b,A}	0,208 ^{a,A}
1:10.000 ⁽²⁾	0,151 ^{a,b,A}	0,130 ^{a,b,A}	0,130 ^{a,b,c,A}	0,125 ^{a,b,c,A}
1:20.000 ⁽²⁾	0,081 ^{a,b,A}	0,081 ^{b,c,A}	0,075 ^{b,c,A}	0,079 ^{b,c,A}
1:40.000 ⁽¹⁾	0,041 ^{b,A}	0,041 ^{c,A}	0,042 ^{c,A}	0,037 ^{c,A}

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

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

Resultado convergente foi obtido por Thomaz-Soccol et al. (2010) que padronizaram a diluição de 1:5.500 para o conjugado. Outros autores também utilizaram diferentes diluições de conjugado nos protocolos do ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina, como Ogunremi e Benjamin (2010) que utilizaram a diluição de 1:10.000 e Brandt et al. (1992) que utilizaram 1:1.000. Já Ferrer et al. (2003) e Abuseir et al. (2007) usaram a diluição de conjugado de 1:8.000. No entanto, estes autores não utilizaram os mesmos antígenos empregados nesta pesquisa.

3.2.3. Substância bloqueadora

Entre as substâncias bloqueadoras, o leite em pó desnatado a 5% apresentou o melhor desempenho ao bloquear os sítios reativos livres, impedindo a ocorrência de reações inespecíficas e, conseqüentemente, aumentando a diferença da amplitude entre as D.O. dos soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina. Este comportamento foi observado em todas as diluições dos soros-controle (1:12,5 a 1:100) e para todos os antígenos (Tabela 14).

Resultados semelhantes foram obtidos por Monteiro et al. (2007) e Monteiro et al. (2008) que, ao avaliarem a eficiência do leite em pó desnatado, BSA e gelatina, também encontraram melhor desempenho ao utilizar o leite.

Pinto (1998), também obteve melhor desempenho do ELISA para o diagnóstico da cisticercose suína utilizando o leite em pó desnatado a 5%, com seus resultados superando os efeitos do BSA, gelatina e da ausência de bloqueio nas placas.

A grande discrepância dos resultados em favor do leite desnatado revela a importância de se selecionar uma boa solução bloqueadora em protocolos laboratoriais do ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina, uma vez que esta é a principal etapa que determina o desempenho do teste em diferenciar animais positivos dos negativos.

Já entre as diluições dos soros-controle testadas, as que apresentaram melhor desempenho e escolhidas para a etapa seguinte foram 1:50 e 1:100, em todos os antígenos (Tabela 14), o que permite utilizar o teste em situações de pouca quantidade de soro disponível sem interferir no seu desempenho.

Em outra pesquisa, Minozzo et al. (2004) também obtiveram melhor resultado ao utilizarem a diluição de 1:100 para os soros. Monteiro et al. (2008) observaram maior diferença entre os soros negativos e positivos para a cisticercose bovina nas diluições 1:25 e 1:50.

Em contraste, Ogunremi e Benjamin (2010) utilizaram 1:10 como a diluição dos soros utilizados no teste ELISA; enquanto Bøgh et al. (1996) utilizaram a diluição de 1:1.000 para os soros. Já Ferrer et al. (2003) utilizou 1:800 como a diluição dos soros e Thomaz-Soccol et al. (2010) padronizaram a diluição de 1:200 para os soros no ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina.

Tabela 14. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com diferentes substâncias bloqueadoras e diluições dos soros para o antígeno total (T), total sonicado (Ts), total dialisado (Td), membrana (M), líquido vesicular (LV) e líquido vesicular sonicado (LVs) de *Taenia crassiceps*.

Antígeno/Diluição dos soros- controle	Substâncias bloqueadoras				
	leite em pó desnatado 5% ^(1,2)	caseína 2% ^(1,2)	BSA 1% ^(1,2)	gelatina 2% ⁽²⁾	
T	1:12,5 ⁽¹⁾	⁽¹⁾ 0,163 ^{c,A}	⁽¹⁾ 0,019 ^{c,B}	⁽¹⁾ 0,015 ^{c,B}	0,018 ^{d,B}
	1:25 ⁽¹⁾	0,231 ^{b,c,A}	0,036 ^{b,c,B}	0,032 ^{b,c,B}	0,044 ^{c,B}
	1:50 ⁽¹⁾	0,260 ^{a,b,A}	0,065 ^{a,b,B}	0,064 ^{a,b,B}	0,075 ^{b,A,B}
	1:100 ⁽¹⁾	0,323 ^{a,A}	0,134 ^{a,B}	0,139 ^{a,B}	0,159 ^{a,A,B}
Ts	1:12,5 ⁽¹⁾	⁽²⁾ 0,206 ^{c,A}	⁽²⁾ 0,023 ^{d,B}	⁽²⁾ 0,025 ^{d,B}	0,025 ^{d,B}
	1:25 ⁽¹⁾	0,252 ^{b,A}	0,046 ^{c,B}	0,041 ^{c,B}	0,042 ^{c,B}
	1:50 ⁽¹⁾	0,302 ^{a,A}	0,089 ^{b,B}	0,077 ^{b,B}	0,084 ^{b,B}
	1:100 ⁽¹⁾	0,324 ^{a,A}	0,140 ^{a,B}	0,149 ^{a,B}	0,151 ^{a,B}
Td	1:12,5 ⁽¹⁾	⁽²⁾ 0,205 ^{d,A}	⁽²⁾ 0,031 ^{d,B}	⁽²⁾ 0,029 ^{d,B}	0,027 ^{d,B}
	1:25 ⁽¹⁾	0,271 ^{c,A}	0,062 ^{c,B}	0,059 ^{c,B}	0,049 ^{c,B}
	1:50 ⁽¹⁾	0,323 ^{b,A}	0,093 ^{b,B}	0,102 ^{b,B}	0,095 ^{b,B}
	1:100 ⁽¹⁾	0,366 ^{a,A}	0,169 ^{a,B}	0,168 ^{a,B}	0,174 ^{a,B}
M	1:12,5 ⁽¹⁾	⁽²⁾ 0,265 ^{b,A}	⁽²⁾ 0,036 ^{d,B}	⁽¹⁾ 0,039 ^{c,B}	0,030 ^{d,B}
	1:25 ⁽¹⁾	0,325 ^{a,A}	0,066 ^{c,B}	0,065 ^{b,c,B}	0,059 ^{c,B}
	1:50 ⁽¹⁾	0,324 ^{a,A}	0,118 ^{b,B}	0,111 ^{a,b,B}	0,094 ^{b,B}
	1:100 ⁽¹⁾	0,313 ^{a,A}	0,199 ^{a,B}	0,192 ^{a,B}	0,179 ^{a,B}
LV	1:12,5 ⁽¹⁾	⁽²⁾ 0,166 ^{c,A}	⁽²⁾ 0,030 ^{d,B}	⁽¹⁾ 0,026 ^{c,B}	0,016 ^{d,B}
	1:25 ⁽¹⁾	0,224 ^{b,A}	0,049 ^{c,B}	0,050 ^{b,c,B}	0,045 ^{c,B}
	1:50 ⁽¹⁾	0,259 ^{a,b,A}	0,096 ^{b,B}	0,100 ^{a,b,B}	0,087 ^{b,B}
	1:100 ⁽¹⁾	0,292 ^{a,A}	0,147 ^{a,B}	0,162 ^{a,B}	0,152 ^{a,B}
LVs	1:12,5 ⁽¹⁾	⁽²⁾ 0,209 ^{b,A}	⁽²⁾ 0,031 ^{d,B}	⁽²⁾ 0,033 ^{d,B}	0,026 ^{d,B}
	1:25 ⁽¹⁾	0,249 ^{a,b,A}	0,057 ^{c,B}	0,076 ^{c,A,B}	0,058 ^{c,B}
	1:50 ⁽¹⁾	0,268 ^{a,A}	0,098 ^{b,B}	0,118 ^{b,A,B}	0,094 ^{b,B}
	1:100 ⁽¹⁾	0,266 ^{a,A}	0,133 ^{a,B}	0,186 ^{a,B}	0,165 ^{a,B}

NOTA: (1) Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na mesma coluna e uma maiúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si para cada antígeno separadamente pelo teste Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

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

3.2.4. Comparação da eficiência entre os antígenos

Os resultados dos desempenhos de cada antígeno, em suas melhores condições e em função das diluições dos soros-controle, estão dispostos na Tabela 15.

Quando comparada a eficiência dos diferentes antígenos em diferenciar bovinos positivos e negativos para a cisticercose, o antígeno M apresentou resultado superior aos demais em ambas as diluições de soros-controle testadas (1:50 e 1:100), exceto em relação ao antígeno T, que mostrou desempenho semelhante na diluição 1:100. Este resultado evidencia a importância deste antígeno, de uso restrito no diagnóstico imunológico da cisticercose bovina. Além do seu alto desempenho, o emprego desse antígeno na prática tem como vantagem a sua fácil produção, uma vez que é um complemento do preparo do antígeno LV, por sua vez obtido basicamente por centrifugação, o que leva a um aproveitamento de todo material biológico obtido em laboratório durante as práticas de preparo de antígenos, evitando, assim, desperdício de um precioso material biológico de pesquisa.

Além disso, o tegumento (membrana) do parasita possui importante função em relação ao hospedeiro, em termos de absorção de nutrientes e mecanismos de evasão (Lumsden et al., 1982 citado por Vaz et al., 1997).

Na diluição 1:50, o desempenho do antígeno M foi seguido pelos antígenos Ts, T e Td e, na diluição 1:100, estes antígenos também apresentaram comportamento análogo, na seguinte ordem: T, Td e Ts.

Não houve diferença significativa em decorrência dos processos de sonicação e diálise quando comparados com o antígeno total e vesicular.

Já os antígenos LV e LVs apresentaram desempenho inferior em relação aos demais, nas diluições 1:50 e 1:100. Isto pode ser consequência da menor quantidade de peptídeos apresentada por estes antígenos e, principalmente, pelo menor número de peptídeos de baixa massa molecular (Tabela 1, Figura 1), considerados específicos para o diagnóstico da cisticercose bovina (Giroto et al., 2009). Isto pode ocasionar, no ELISA, dificuldade em diferenciar bovinos positivos e negativos para a cisticercose, uma vez que reações específicas irão ocorrer em menor proporção.

Ao comparar a eficiência dos antígenos total e de líquido vesicular de larva de *T. crassiceps*, Monteiro (2004) também relatou desempenho superior pelo antígeno total em relação ao de líquido vesicular ao diferenciar soros de bovinos positivos e negativos para a cisticercose.

Entre as diluições, a que apresentou as maiores amplitudes de D.O. entre soros-controle positivos e negativos, em todos os antígenos, foi a diluição de 1:100, sendo, portanto a diluição de escolha para os soros, que além de

apresentar melhor desempenho, tem a vantagem economizar a quantidade de soro disponibilizada para o teste.

Tabela 15. Média das diferenças das amplitudes das densidades ópticas entre os soros-controle positivos e negativos para a cisticercose bovina de acordo com os diferentes antígenos de *Taenia crassiceps* (em suas melhores condições previamente definidas) e diluições dos soros.

Antígenos	Diluições dos soros-controle	
	1:50 ⁽¹⁾	1:100 ⁽²⁾
membrana (M)	0,317 ^a	0,365 ^a
total (T)	0,272 ^{b,c}	0,337 ^{a,b}
total sonicado (Ts)	0,282 ^b	0,324 ^{b,c}
total dialisado (Td)	0,268 ^{b,c}	0,342 ^{a,b}
líquido vesicular sonicado (LVs)	0,246 ^{c,d}	0,288 ^c
líquido vesicular (LV)	0,229 ^d	0,286 ^c

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

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

4. CONCLUSÃO

Os protocolos definidos para cada antígeno de *Taenia crassiceps*, que apresentaram resultados satisfatórios no ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina, foram:

- Antígeno total:
 - Concentração de antígeno: 40 µg/ml
 - Diluição do conjugado: 1:1.250
 - Diluição do soro: 1:100
 - Substância bloqueadora: leite em pó desnatado a 5%
- Antígeno total sonicado:
 - Concentração de antígeno: 40 µg/ml
 - Diluição do conjugado: 1:1.250
 - Diluição do soro: 1:100
 - Substância bloqueadora: leite em pó desnatado a 5%
- Antígeno total dialisado:
 - Concentração de antígeno: 40 µg/ml

- Diluição do conjugado: 1:2.500
- Diluição do soro: 1:100
- Substância bloqueadora: leite em pó desnatado a 5%
- Antígeno de membrana:
 - Concentração de antígeno: 40 µg/ml
 - Diluição do conjugado: 1:1.250
 - Diluição do soro: 1:100
 - Substância bloqueadora: leite em pó desnatado a 5%
- Antígeno de líquido vesicular:
 - Concentração de antígeno: 10 µg/ml
 - Diluição do conjugado: 1:2.500
 - Diluição do soro: 1:100
 - Substância bloqueadora: leite em pó desnatado a 5%
- Antígeno de líquido vesicular sonicado:
 - Concentração de antígeno: 10 µg/ml
 - Diluição do conjugado: 1:2.500
 - Diluição do soro: 1:100
 - Substância bloqueadora: leite em pó desnatado a 5%

O desempenho do ELISA é influenciado diretamente por cada componente do teste, principalmente pela substância bloqueadora, destacando-se o leite em pó como a mais eficiente entre as testadas a diferenciar soros de animais positivos e negativos para a cisticercose bovina. No entanto, os processos empregados para a sonicação e a diálise de antígenos não aumentaram o desempenho do teste.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSEIR, S.; KÜHNE, M.; SCHNIEDER, T.; KLEIN, G.; EPE, C. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. **Parasitology Research**, v.101, 131-137, 2007.

BØGH, H.O.; LIND, P.; SØNDERBY, B.V.; KYVSGAARD, N.C.; MAEDA, G.E.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P. Immunodiagnosis of *Taenia saginata* in cattles

using hydrophobic antigens from *T. hydatigena* metacestode cyst fluid. **Applied Parasitology**, v.36, p.226-238, 1996.

BRANDT, J.R.A.; GEERTS, S.; DE DEKEN, R.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; BRIJS, L.; FALLA, N. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **International Journal for Parasitology**, v.22, n.4, p.471-477, 1992.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29-03-52, alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, nº 1.812 de 08-02-96 e nº 2.244 de 04-06-97. Brasília, 1997. 174p.

BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; MIELLE, S.R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.1, p.146-151, 2000.

DUTRA, L.H.; GIROTTO, A.; VIEIRA, R.F.C.; VIEIRA, T.S.W.J.; ZANGIROLAMO, A.F.; MARQUÊS, F.A.C.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO, O. The prevalence and spatial epidemiology of cysticercosis in slaughtered cattle from Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.5, p.1887-1896, 2012.

DRAELANTS, E.; HOFKENS, E.; HARDING, E.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. **Research in Veterinary Science**, v.58, p.99-100, 1995.

FERRER, E.; BENITEZ, L.; FOSTER-CUEVAS, M.; BRYCE, D.; WAMAE, L.W.; ONYANGO-ABUJE, J.A.; GARATE, T.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the

diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.83-94, 2003.

GEERTS, S.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; MORTELMANS, J. Serodiagnosis of *T. saginata* cysticercosis in experimentally infected cattle by enzyme linked immunosorbent assay. **Research in Veterinary Science**, v.30, n.3, p.288-293, 1981.

GIROTTO, A.; PINTO, P.S.A.; DIAS, J.C.O.; CHAVES, L.S.; FERREIRA, H.C.C. Detecção de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina no immunoblot. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1147-1151, 2009.

HAYUNGA, E.G.; WONG, M.M.; SUMNER, M.P.; ISENSTEIN, R.S. Evaluation of a “dipstick” immunoassay to detect cysticercosis in experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, v.38, p.13-22, 1991.

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

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

MONTEIRO, L.L. **Emprego de antígenos de larvas de *Taenia crassiceps* e *Taenia solium* em teste ELISA para diagnóstico da cisticercose bovina**, 2004. 92f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

MONTEIRO, L.L.; PINTO, P.S.A.; SALCEDO, J.H.P.; ARAÚJO, J.V.; SANTOS, W.L.M.; CECON, P.R. Antígenos de larva de *Taenia solium* em ELISA para diagnóstico da cisticercose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.21-25, 2007.

MONTEIRO, L.L.; PINTO, P.S.A.; BEVILACQUA, P.D.; SANTOS, I.F.; MAIA, A.A.M.; DIAS, F.S. Ensaio de padronização do teste ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina utilizando antígenos de larva de *Taenia crassiceps*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.15, n.1, p.45-49, 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.

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

ORYAN, A.; MOGHADDAR, N.; GAUR, S.N.S. *Taenia saginata* cysticercosis in cattle with special reference to its prevalence, pathogenesis and economic implications in Fars Province of Iran. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.319-327, 1995.

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

PINTO, P.S.A. **Diagnóstico imunológico da cisticercose suína como contribuição à inspeção de carnes**, 1998. 157f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.

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

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, V.K.; PESSOA, O.L.; MINOZZO, J.C.; PESSOA-SILVA, M.C.; PEIXOTO, R.P.M.G.; MOURA, J.F. 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.

VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.F.; LIVRAMENTO, J.A.; SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M.; FERREIRA, W. 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.

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C.; GOLIM, M.A.; PAULAN, S.C.; BIONDI, G.F.; ROSSI-FERREIRA, R.; DEFFUNE, E.; NUNES, C.M. *Taenia saginata*: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens. **Experimental Parasitology**, v.126, p.621-625, 2010.

CAPÍTULO 2

Desempenho do teste ELISA no diagnóstico da cisticercose em bovinos abatidos utilizando diferentes antígenos de larva de *Taenia crassiceps*

RESUMO

Ensaio foram conduzidos para avaliar a eficiência de antígenos de larva de *Taenia crassiceps* (Tcra) no teste ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina. Três antígenos foram avaliados: total (T), total sonicado (Ts) e de membrana (M). As amostras analisadas foram soros-controle positivos e negativos para a cisticercose, além de soros de bovinos com outras patologias. As taxas de sensibilidade para o teste ELISA foram respectivamente, com 2 e 3 desvios-padrão, 85,0 e 81,25% para o antígeno T, 82,5 e 78,75% para o antígeno Ts e 80,0 e 80,0% para o antígeno M; as taxas de especificidade, com 2 e 3 desvios-padrão, foram respectivamente: 47,5 e 58,75% para o antígeno T, 65,0 e 73,75% para o antígeno Ts e 58,75 e 62,5% para o antígeno M. Estes resultados demonstram que o ELISA apresentou taxa de sensibilidade superior ao exame anatomopatológico realizado durante a rotina de inspeção relatada por outros estudos, no entanto, o exame *post mortem* é superior quanto a especificidade, uma vez que é considerado altamente específico. Assim, a combinação de ambos os testes diagnósticos deve ser valorizada na detecção da cisticercose bovina, demonstrando a aplicabilidade prática do ELISA.

Palavras-chave: Cisticercose bovina, ELISA, *Taenia crassiceps*, taxas de desempenho.

ABSTRACT

Tests were conducted to evaluate the efficiency of antigens of larval *Taenia crassiceps* (Tcra) in the ELISA test for the diagnosis of bovine cysticercosis. Three antigens were evaluated: total (T), total sonicated (Ts) and membrane (M). The analyzed samples were positive and negative control sera for cysticercosis, and sera of bovine with other pathologies. The rates of sensitivity for ELISA test were respectively, with 2 and 3 standard deviations, 85.0 and

81.25% for T antigen, 82.5 and 78.75% for Ts antigen, and 80.0 and 80.0% for M antigen; specificity rates, with 2 and 3 standard deviations, were respectively: 47.5 and 58.75% for T antigen, 65.0 and 73.75% for Ts antigen, and 58.75 and 62.5% for M antigen. These results demonstrate that the ELISA test had a higher sensitivity rate to the anatomical pathology examination performed during routine inspection reported by other studies; however, the *post-mortem* examination is superior in specificity, once it is considered highly specific. Thus, the combination of both diagnostic tests must be valued on the detection of bovine cysticercosis, demonstrating the practical applicability of the ELISA test.

Keywords: bovine cysticercosis, ELISA, *Taenia crassiceps*, performance rates.

1. INTRODUÇÃO

A cisticercose bovina, causada pela forma larvar do parasita intestinal humano *Taenia saginata*, tem implicações estéticas na carne e de segurança alimentar nos consumidores de carne bovina. Também gera impacto econômico no setor de bovinocultura de corte, devido à condenação de carcaças com infecção intensa e depreciação do valor de carcaças com infecção discreta, em decorrência do tratamento pelo frio (Miranda, 2002; Allepuz et al., 2012, Scandrett et al., 2012).

Considera-se infecção intensa a presença de um ou mais cistos em pelo menos duas superfícies diferentes de exame ou numa área correspondente a aproximadamente à da palma da mão e infecção discreta quando um cisticerco é encontrado na rotina de inspeção (Brasil, 1997).

Esta zoonose apresenta distribuição cosmopolita, sendo mais frequente em países em desenvolvimento (Oliveira et al., 2011). No Brasil, é considerada a principal causa de condenação de carcaças de bovinos em estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (Fukuda et al., 2003).

A inspeção *post mortem*, principal medida de controle, falha ao detectar algumas carcaças infectadas, apresentando sensibilidade de 10-50% (Abuseir et al., 2006; Scandrett et al., 2009; Eichenberger et al., 2011; Calvo-Artavia et al., 2012). Portanto, o controle da doença em humanos pode ser dificultado pela baixa sensibilidade da inspeção de carnes, demandando o emprego de testes mais eficientes (Dorny e Praet, 2007).

Conseqüentemente, tem sido direcionados esforços para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais confiáveis, incluindo métodos *ante mortem*, como os testes sorológicos (Smith et al., 1991). O ELISA tem sido proposto para auxiliar no diagnóstico da cisticercose bovina. No entanto, os protocolos mais utilizados vêm mostrando dificuldade em detectar anticorpos em animais naturalmente infectados que, na maioria dos casos, apresentam infecções discretas (Geerts et al., 1981; Monteiro et al., 2006).

Como o antígeno é o principal determinante na execução de um ELISA desenvolvido para detectar anticorpos, alguns estudos têm centrado na forma de avaliar e comparar diferentes preparações antigênicas (Ogunremi e Benjamin, 2010). Resultados promissores foram obtidos usando antígenos heterólogos de *Taenia crassiceps*, que apresenta como principais vantagens a fácil manutenção em laboratório e a homogeneidade entre lotes (Geerts et al., 1981; Monteiro et al., 2006; Pinto et al., 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do ELISA, através das taxas de desempenho, utilizando três antígenos de *Taenia crassiceps*, frente a diferentes categorias de soros-controle de bovinos abatidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Antígenos

O presente ensaio envolveu a análise comparativa dos seguintes antígenos de larva de *Taenia crassiceps* (Tcra): total (T), total sonificado (Ts) e de membrana (M). Os antígenos foram obtidos através da inoculação intraperitoneal em camundongos BALB/c fêmeas com 30 dias de idade. Após 90 dias de inoculação, os camundongos que apresentaram aumento de volume abdominal, devido à reprodução por brotamento dos cisticercos, foram eutanasiados e os parasitos retirados da cavidade peritoneal. Foram eliminados aqueles que estavam em fase de degeneração ou calcificação, sendo os cisticercos viáveis utilizados no preparo dos antígenos, descritos em seguida.

2.1.1. Antígeno total de larva de *Taenia crassiceps* (T)

Os cisticercos foram congelados e, em seguida, submetidos às seguintes etapas: desidratação “overnight” por liofilização; trituração dos cisticercos liofilizados em gral de porcelana e pesagem do pó obtido; adição de solução salina 0,15M obtendo uma proporção final de 6,5 a 10% (pó); homogeneização, em banho de gelo, em homogeneizador de tecidos tipo Potter; centrifugação do material obtido a 17.400g/30min/4°C, sendo separado o sobrenadante. No material resultante, foi adicionado o inibidor de protease Sigma P7626 (0,25M – 10 µl/ml) (PMSF – Fluoreto de fenilmetilsufonil, Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA) e o antígeno foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

2.1.2. Antígeno total sonicado de larva de *Taenia crassiceps* (Ts)

O preparo do antígeno Ts de larva de Tcra consistiu das mesmas etapas do antígeno T (item 2.1.1), sendo que após a homogeneização, o material passou por um tratamento com ultrassom de acordo com a metodologia de Minozzo et al. (2004). A solução sofreu sonicação, de quatro ciclos, com uma frequência de 20 Khz e com amperagem de 1 mA durante 30 segundos e com intervalos também de 30 segundos. Após este procedimento, o material foi centrifugado a 17.400g/30min/4°C e ao sobrenadante foi adicionado o PMSF (0,25M – 10 µl/ml). O antígeno foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

2.1.3. Antígeno de membrana de larva de *Taenia crassiceps* (M)

O antígeno foi obtido através da centrifugação dos cisticercos a 35.000g/30min/4°C. Com o rompimento das vesículas, o sobrenadante foi separado e as membranas (sedimento) foram congeladas a -20°C e, em seguida, foram submetidas às mesmas etapas descritas no item 2.1.1.

2.2. Amostras de soros

Foram utilizadas quatro categorias de soros-controle nos ensaios do ELISA: soros de bovinos experimentalmente infectados com 120.000 ovos de *T. saginata* (40), soros de bovinos naturalmente infectados com infecção discreta (com um cisticerco a inspeção *post mortem*; 10 soros) e com infecção de moderada a intensa (com mais de um cisticerco a inspeção *post mortem*; 30

soros), soros de bovinos negativos para cisticercose (40) e soros de bovinos com outras doenças (40). Dentre os soros de outras doenças, estão incluídos soros de animais com hidatidose (15), fasciolose (15) e tuberculose (10).

Os diagnósticos foram confirmados por meio do exame anatomopatológico realizado durante a rotina de inspeção *post mortem* em Matadouros-Frigoríficos, com base nas indicações técnicas, previstas nos procedimentos de rotina do Serviço de Inspeção Federal (Brasil, 1971). Entre os animais positivos para a cisticercose foram identificados bovinos com cistos viáveis, não viáveis e bovinos com cistos em ambos os estágios.

2.3. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Foram realizados ensaios do ELISA com as diferentes preparações antigênicas de larva de *Tcra*, nas seguintes concentrações: 40 µg/ml do antígeno T, 40 µg/ml do antígeno Ts e 40 µg/ml do antígeno M.

As placas de poliestireno foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6, de modo a obter as concentrações finais descritas acima, durante 1 hora a 37°C. Foi realizado o bloqueio dos sítios reativos (leite desnatado a 5% em PBS pH 7,4), durante 1 hora a 37°C. As amostras de soros diluídas na proporção de 1:100 em leite desnatado a 1% em PBS pH 7,4 foram adicionadas em triplicatas nas placas e as mesmas incubadas por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG bovino A-5295 (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA), na diluição 1:1.250, e repetido o procedimento de incubação. Após cada etapa de incubação, foram realizadas três lavagens de cinco minutos em solução salina contendo 0,05% de Tween-20, em uma Lavadora Automática de Microplacas ELX50 – Biotek, para remoção do excesso dos reagentes. A etapa final consistiu da revelação da reação com solução de OPD (0,1%) e H₂O₂ 0,003% em tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, durante um período de incubação de 5 minutos. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 4N. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro próprio a 492nm e os resultados foram obtidos em densidades ópticas. A quantidade dos reagentes aplicados à placa foi 100µl, exceto para a solução bloqueadora, 200µl.

Em cada placa foram adicionados dois soros-controle negativos (bovinos negativos para a cisticercose a inspeção *post mortem*) e um soro-controle

positivo (bovino experimentalmente infectado com ovos de *T. saginata*), para o cálculo do ponto de corte e correção da placa.

2.4. Análise dos resultados

2.4.1. Correção das placas

Visando corrigir as variações entre placas que podem ocorrer na realização do ELISA em virtude da sua alta sensibilidade, os valores foram ajustados para uma placa padrão seguindo as seguintes fórmulas:

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

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

Onde Po é a média dos controles positivos da placa padrão; No é a média dos controles negativos da placa padrão; Pt é a média dos controles positivos da placa teste; Nt é a média dos controles negativos da placa teste; e St é a média da amostra testada.

2.4.2. Cálculo do ponto de corte e das taxas de desempenho do teste

Para determinar a positividade e a negatividade de cada amostra, foram calculados pontos de corte, definidos como a média das densidades ópticas (D.O.) das reações obtidas com os soros-controle negativos, acrescida de dois ou três desvios-padrão (DP).

O desempenho do ELISA foi avaliado através de cálculos das taxas de desempenho do teste, sensibilidade e especificidade, e os resultados (positivos e negativos) encontrados no teste foram dispostos em tabela de contingência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das reações obtidas pelo ELISA (positivas e negativas) para cada grupo de soros-controle, com os diferentes antígenos e pontos de corte, estão dispostos na Tabela 1. Os pontos de corte, utilizando 2 e 3 DP respectivamente, foram 0,111 e 0,116 para o antígeno T, 0,133 e 0,143 para o antígeno Ts e 0,074 e 0,078 para o antígeno M. Amostras que apresentaram

D.O. igual ou superior ao ponto de corte foram consideradas positivas, enquanto as que apresentaram D.O. inferior, negativas.

Tabela 1. Frequência de reações positivas (Pos) e negativas (Neg) para cisticercose bovina no ELISA, de acordo com os tipos de ponto de corte e antígeno.

Grupos de soros- controle*	Ponto de corte (DP)											
	2 DP						3 DP					
	T		Ts		M		T		Ts		M	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
1	40	0	40	0	40	0	40	0	40	0	40	0
2	28	12	26	14	24	16	25	15	23	17	24	16
2a	22	8	22	8	20	10	20	10	19	11	20	10
2b	6	4	4	6	4	6	5	5	4	6	4	6
3	11	29	7	33	9	31	8	32	2	38	7	33
4	31	9	21	19	24	16	25	15	19	21	23	17

DP: desvio-padrão

T: antígeno total

Ts: antígeno total sonicado

M: antígeno de membrana

* 1: soros de bovinos experimentalmente infectados; 2: soros de bovinos naturalmente infectados; 2a: soros de bovinos naturalmente infectados com mais de um cisticerco a inspeção *post mortem*; 2b: soros de bovinos naturalmente infectados com um cisticerco a inspeção *post mortem*; 3: soros de bovinos negativos para a cisticercose; 4: soros de bovinos com outras patologias.

As taxas de sensibilidade e especificidade para os três antígenos testados no ELISA estão resumidas na Tabela 2. O antígeno T apresentou a maior sensibilidade, enquanto o antígeno Ts apresentou a maior especificidade; já o antígeno de membrana apresentou desempenho intermediário. Contudo, os desempenhos dos antígenos foram bons, próximos, devendo ser valorizada a utilização dos mesmos também pela facilidade de produção, padronização e manutenção laboratorial.

Tabela 2. Taxas de desempenho (%) do teste ELISA com 2 e 3 desvios-padrão (DP) obtidas pelo uso dos diferentes antígenos de *T. crassiceps* e grupos de soros-controle com base na inspeção *post mortem*.

Parâmetros de desempenho	Grupos de soros-controle*	Antígeno/Ponto de corte (DP)					
		T		Ts		M	
		2DP	3DP	2DP	3DP	2DP	3DP
Sensibilidade	1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	2	70,0	62,5	65,0	57,5	60,0	60,0
	2a	73,3	66,7	73,3	63,3	66,7	66,7
	2b	60,0	50,0	40,0	40,0	40,0	40,0
	1+2	85,0	81,25	82,5	78,75	80,0	80,0
Especificidade	3	72,5	80,0	82,5	95,0	77,5	82,5
	4	22,5	37,5	47,5	52,5	40,0	42,5
	3+4	47,5	58,75	65,0	73,75	58,75	62,5

DP: desvio-padrão

T: antígeno total

Ts: antígeno total sonicado

M: antígeno de membrana

* 1: soros de bovinos experimentalmente infectados; 2: soros de bovinos naturalmente infectados; 2a: soros de bovinos naturalmente infectados com mais de um cisticerco a inspeção *post mortem*; 2b: soros de bovinos naturalmente infectados com um cisticerco a inspeção *post mortem*; 3: soros de bovinos negativos para a cisticercose; 4: soros de bovinos com outras patologias.

As amostras de soros de bovinos experimentalmente infectados com ovos de *T. saginata* apresentaram resultados positivos no ELISA em todas as três preparações antigênicas de Tcra, alcançando 100,0% de sensibilidade. Resultados semelhantes para animais positivos experimentais foram relatados por diversos autores. Abuseir et al. (2007) também encontraram 100,0% de sensibilidade; enquanto Geerts et al. (1981) encontraram sensibilidade de 96,88%. Já Ogunremi e Benjamim (2010) obtiveram sensibilidade de 92,9% em seu estudo. Em outra pesquisa, apesar de apresentar resultados inferiores, Monteiro et al. (2006) também encontraram taxas de sensibilidade satisfatórias para esta categoria de soro-controle, variando de 75,0 a 90,0%.

Pinto et al. (2006) ao utilizar o antígeno total de *T. crassiceps*, encontraram 90,0% de sensibilidade para animais experimentalmente infectados, utilizando 2 DP como ponto de corte, comprovando o bom desempenho do ELISA em detectar anticorpos em animais experimentalmente infectados.

Já para os bovinos com a cisticercose natural, foram observadas algumas reações falso-negativas (Tabela 1), ao contrário do grupo de animais experimentalmente infectados, resultando numa redução na sensibilidade, que

variou de 60,0 a 70,0% e de 57,5 a 62,5%, com 2 e 3 DP, respectivamente. Thomaz-Soccol et al. (2010) obtiveram resultados ainda melhores, com 83,6% de sensibilidade para bovinos positivos naturais para a cisticercose. Ambos os resultados foram superiores as taxas de sensibilidade relatadas em estudos anteriores para a inspeção *post mortem* (Abuseir et al., 2006; Scandrett et al., 2009; Eichenberger et al., 2011; Calvo-Artavia et al., 2012).

Em contraste com estes resultados, alguns autores obtiveram baixo desempenho ao detectar anticorpos produzidos por animais naturalmente infectados pelo ELISA. Geerts et al. (1981), Monteiro et al. (2006) e Pinto et al. (2006) encontraram sensibilidades de 37,5%, 5,0 a 31,6% e 3,3 a 20,0%, respectivamente.

A diferença encontrada entre as taxas de sensibilidade para animais naturalmente e experimentalmente infectados, também observada em outros estudos, se deve provavelmente a dose de ovos ingerida pelos animais. Animais naturalmente infectados geralmente apresentam infecções discretas, em decorrência da ingestão acidental de ovos dispersos no ambiente, enquanto os animais experimentalmente infectados foram inoculados com altas doses de ovos (120.000) e apresentaram infecção intensa. Sendo assim, a intensidade da resposta imune pode ser proporcional à quantidade de ovos ingeridos pelo animal. Este comportamento também pôde ser observado entre os animais positivos naturais avaliados nesta pesquisa, uma vez que os que possuíam apenas um cisticerco apresentaram sensibilidade inferior no ELISA em relação aos que apresentaram mais de um cisticerco durante a inspeção *post mortem* (Tabela 2).

Ainda, estudos realizados em animais experimentalmente infectados com diferentes doses de ovos confirmaram que o nível de anticorpos produzidos é dependente da dose de ovos ingerida, além de que essa produção é mais lenta em animais com infecções discretas (Smith et al., 1991). Neste sentido, a principal dificuldade encontrada com relação à sorologia para a cisticercose bovina é o baixo nível de anticorpos produzidos por animais com infecções discretas (Smith et al., 1991).

Ao analisar soros de 40 bovinos negativos para a cisticercose a inspeção *post mortem*, as taxas de especificidade foram satisfatórias, variando de 72,5 a 82,5% e 80,0 a 95,0%, com 2 e 3 DP respectivamente. Os poucos resultados falso-positivos podem ser atribuídos a reações inespecíficas, uma

vez que estes animais foram criados a campo, em condições não controladas, estando expostos a diversos patógenos. No entanto, não pode ser descartada a opção de que alguns desses animais possam ser de fato positivos para a cisticercose, já que a sensibilidade da técnica de inspeção *post mortem* é baixa para animais com infecção discreta.

Ogunremi e Benjamim (2010) encontraram taxa de especificidade semelhante, 90,6%, para bovinos negativos para a cisticercose. Assim como Thomaz-Soccol et al. (2010) que ao analisarem soros de bovinos abatidos negativos para a cisticercose, encontraram 92,8% de especificidade com 3 DP de ponto de corte. Geerts et al. (1981) também obtiveram resultado significativo, com 94,0% de especificidade, sendo que o ELISA foi capaz de detectar dois animais considerados negativos pela inspeção, que, após exame mais detalhado da carcaça, foi comprovada a presença de cisticercos.

Entretanto, apesar da alta especificidade do ELISA quando analisados soros de animais negativos para a cisticercose, um alto número de reações falso-positivas foi observado, em todos os antígenos testados, com os soros de bovinos com outras doenças, tanto com fasciolose, hidatidose e tuberculose. A especificidade variou de 22,5 a 47,5% e 37,5 a 52,5%, com 2 e 3DP respectivamente, demonstrando a ocorrência de reações cruzadas entre as infecções. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Kyvsgaard et al. (1991) que observaram que a especificidade do ELISA é o principal entrave para sua aplicação no diagnóstico individual. Além disso, um dos principais motivos para a baixa especificidade é a grande sobreposição antigênica que existe entre cestoides e outros parasitas (Smith et al., 1990).

A Tabela 3 exemplifica a frequência de reações negativas e a taxa de especificidade para cada patologia, de acordo com o antígeno e o ponto de corte. As três patologias apresentaram elevado número de reações cruzadas com a cisticercose bovina nos diferentes antígenos e, conseqüentemente, baixa especificidade. As patologias responsáveis por maior número de reações cruzadas foram fasciolose, para o antígeno T, hidatidose para o antígeno Ts, e tuberculose para o antígeno M. Apenas a fasciolose apresentou taxas de especificidade superiores a 50%, mas somente com 3 DP nos antígenos Ts e M. Geerts et al. (1981) também verificaram reação cruzada com a cisticercose bovina de um animal com fasciolose, no entanto, o mesmo não foi observado por Pinto et al. (2006) e Monteiro et al. (2006).

Tabela 3. Frequência de reações negativas para a cisticercose bovina e especificidade do teste ELISA nas amostras de bovinos com diferentes patologias, de acordo com o antígeno e o ponto de corte.

Patologia*	Antígeno/Ponto de corte (DP)					
	T		Ts		M	
	2DP	3DP	2DP	3DP	2DP	3DP
Hidatidose	4 (26,7%)	6 (40,0%)	7 (46,7%)	7 (46,7%)	6 (40,0%)	6 (40,0%)
Fasciolose	2 (13,3%)	4 (26,7%)	7 (46,7%)	9 (60,0%)	7 (46,7%)	8 (53,3%)
Tuberculose	3 (30,0%)	5 (50,0%)	5 (50,0%)	5 (50,0%)	3 (30,0%)	3 (30,0%)

DP: desvio-padrão

T: antígeno total

Ts: antígeno total sonicado

M: antígeno de membrana

* Hidatidose: 15 amostras de soros; Fasciolose: 15 amostras de soros; Tuberculose: 10 amostras de soros.

Confrontando estes resultados, Pinto et al. (2006) e Monteiro et al. (2006) observaram pequeno número de reações cruzadas, no entanto, ponderam que o número de amostras testadas foi limitado, necessitando de testes adicionais com um maior número de amostras. Geerts et al. (1981) também concluíram, ao analisar soros de bovinos com outras patologias, que o ELISA é um teste bastante específico.

Um fator determinante do desempenho do ELISA é o ponto de corte, que influencia diretamente as taxas de sensibilidade e especificidade. Quando se utiliza 2 DP a sensibilidade do teste é maior, já quando é calculado com 3 DP, a sensibilidade do teste diminui e aumenta a especificidade. Logo, o mesmo deve ser escolhido de acordo com a finalidade do teste. Como a deficiência da inspeção *post mortem* está na sensibilidade, neste caso seria apropriado utilizar o ponto de corte com 2 DP com o objetivo do ELISA tornar-se um teste complementar, pois irá detectar maior número de animais com infecções discretas que poderiam passar despercebidos durante a rotina de inspeção. Além disso, o ponto de corte com 2 DP tem sido considerado como convencional em testes de sorodiagnóstico (Greiner et al., 1995).

Os três antígenos de *Taenia crassiceps* apresentaram resultados semelhantes, com valores de sensibilidade iguais ou superiores a 60% para animais naturalmente infectados, entretanto os valores de absorvância variaram entre os mesmos e em ordem decrescente foram antígeno Ts, antígeno T e antígeno M.

4. CONCLUSÃO

Apesar do ELISA detectar com mais facilidade animais experimentalmente infectados com altas doses de ovos de *T. saginata* em relação aos animais com infecções naturais discretas, ainda assim a sensibilidade apresentada foi satisfatória para este fim, gerando perspectivas para a sua aplicabilidade em animais a campo em pesquisas de triagem de rebanhos quanto à ocorrência de cisticercose.

No entanto, os resultados de especificidade mostram que o ELISA apresentou baixo desempenho ao diferenciar bovinos com cisticercose de bovinos com outras patologias.

Assim, a combinação do ELISA, utilizando um ponto de corte ajustado para uma alta sensibilidade, com o exame anatomopatológico, altamente específico, irá contribuir para o controle da cisticercose bovina auxiliando na destinação correta de carcaças parasitadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSEIR, S.; EPE, C.; SCHNIEDER, T.; KLEIN, G.; KÜHNE, M. Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: is it unequivocal?. **Parasitology Research**, v.99, n.4, p.405-409, 2006.

ABUSEIR, S.; KÜHNE, M.; SCHNIEDER, T.; KLEIN, G.; EPE, C. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. **Parasitology Research**, v.101, 131-137, 2007.

ALLEPUZ, A.; GABRIEL, S.; DORNY, P.; NAPP, S.; JANSEN, F.; VILAR, M.J.; VIVES, L.; PICART, L.; ORTUÑO, A.; GUTIÉRREZ, J.; CASAL, J. Comparison of bovine cysticercosis prevalence detected by antigen ELISA and visual inspection in the North East of Spain. **Research in Veterinary Science**, v.92, p.393-395, 2012.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29-03-52, alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, nº 1.812 de 08-02-96 e nº 2.244 de 04-06-97. Brasília, 1997. 174p.

CALVO-ARTAVIA, F.F.; NIELSEN, L.R.; ALBAN, L. Epidemiologic and economic evaluation of risk-based meat inspection for bovine cysticercosis in Danish cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Article in Press, 2012.

DORNY, P.; PRAET, N. *Taenia saginata* in Europe. **Veterinary Parasitology**, v.149, 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, p.989-992, 2011.

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

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

GREINER, M.; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v.185, p.123-132, 1995.

KYVSGAARD, N.C.; ILSØE, B.; HENRIKSEN, S.A.; FELD, N.C.; NANSEN, P. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of

Taenia saginata cysticercosis in cattle. **ActaVeterinary Scandinavian**, v.32, p.233-241, 1991.

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

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

MONTEIRO, L.L.; PINTO, P.S.A.; DIAS, F.S. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.260-263, 2006.

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.; OLIVEIRA, J.A.C.; BATISTA, T.G.; OLIVEIRA, E.R.A.; NETO, C.C.C.; FILHO, A.F.E. Estudo da prevalência da cisticercose bovina no estado de Alagoas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.1, p.41-46, 2011.

PINTO, P.S.A.; MONTEIRO, L.M.; MINOZZO, J.C. A influência de diferentes grupos de soros-controle no diagnóstico da cisticercose bovina pelo teste ELISA. **Revista Ceres**, v.53, p.574-579, 2006.

SCANDRETT, B.; PARKER, S.; FORBES, L.; GAJADHAR, A.; DEKUMYOY, P.; WAIKAGUL, J.; HAINES, D. Distribution of *Taenia saginata* cysticerci in tissues of experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, v.164, p.223-231, 2009.

SCANDRETT, W.B.; HAINES, D.M.; PARKER, S.E.; ROBINSON, Y.; FORBES, L.B.; BRANDT, J.; GEERTS, S.; DORNY, P.; GAJADHAR, A.A. Validation of an immunohistochemical assay for bovine cysticercosis, with comparison to a

standard histological method. **Veterinary Parasitology**, v.186, p.301-311, 2012.

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.

SMITH, H.J.; SNOWDON, K.E.; GREGORY, D.; FINLEY, G.G. Assessment of an enzyme-linked Immunosorbent assay using a *Taenia hydatigena* fraction antigen in the diagnosis of cysticercosis in cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.54, n.2, p.299-300, 1990.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, V.K.; PESSOA, O.L.; MINOZZO, J.C.; PESSOA-SILVA, M.C.; PEIXOTO, R.P.M.G.; MOURA, J.F. 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.

CAPÍTULO 3

Peptídeos relevantes de *Taenia crassiceps* para o diagnóstico da cisticercose bovina pelo immunoblot

RESUMO

Tendo em vista o conhecimento limitado sobre o diagnóstico da cisticercose bovina pelo immunoblot, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade deste teste, identificando os principais peptídeos com valor diagnóstico. Foram realizados ensaios de immunoblot utilizando antígeno total de larva de *Taenia crassiceps* e 60 soros de bovinos positivos para a cisticercose (30 naturalmente e 30 experimentalmente infectados com ovos de *T. saginata*), 30 soros de bovinos negativos para a cisticercose e 30 soros de bovinos com outras patologias (fasciolose, hidatidose e tuberculose). Os peptídeos de maior importância diagnóstica, em ordem decrescente de acurácia (%) foram os seguintes: 6-8 kDa (90,8%), 129-143 kDa (74,2%), 99-105 kDa (71,7%) e 14-19 kDa (71,1%). Reações cruzadas, em decorrência da fasciolose e hidatidose, foram observadas nos quatro intervalos de peptídeos ressaltados. Os resultados demonstram que o antígeno total de *T. crassiceps* possui peptídeos com alto potencial diagnóstico, sendo, portanto, o immunoblot útil no diagnóstico da cisticercose bovina.

Palavras-chave: Cisticercose bovina, immunoblot, *Taenia crassiceps*, peptídeos.

ABSTRACT

Given the limited knowledge about the diagnosis of bovine cysticercosis by immunoblotting, the objective of this study was to evaluate the applicability of this test, identifying the main peptides with diagnostic value. Immunoblotting assays were performed using total antigen of larval *Taenia crassiceps* and 60 sera of positive bovine for cysticercosis (30 naturally and 30 experimentally infected with eggs of *T. saginata*), 30 sera of negative bovines for cysticercosis and 30 sera of bovine with other pathologies (fasciolosis, hydatidosis and

tuberculosis). The peptides of greater diagnostic importance in decreasing order of accuracy (%) were: 6-8 kDa (90.8%), 129-143 kDa (74.2%), 99-105 kDa (71.7%) and 14-19 kDa (71.1%). Cross-reactions, due to fasciolosis and hydatidosis, were observed in the four intervals of the highlighted peptides. The results show that the total antigen of *T. crassiceps* has peptides with high diagnostic potential, making immunoblotting useful in the diagnosis of bovine cysticercosis.

Keywords: bovine cysticercosis, immunoblotting, *Taenia crassiceps*, peptides.

1. INTRODUÇÃO

O complexo teníase-cisticercose é causado pela *Taenia saginata*, que é responsável por duas doenças distintas, a teníase, no homem, e a cisticercose nos bovinos (Carvalho et al., 2006). A cisticercose bovina é responsável por perdas consideráveis para a indústria da carne e representa um risco à segurança alimentar, uma vez que o homem adquire a teníase ao ingerir carne contendo cisticercos viáveis (Dutra et al., 2012).

Como o principal método de controle da cisticercose bovina, a inspeção de carnes, apresenta baixa sensibilidade para detectar cistos em carcaças com infecções discretas, peças contaminadas podem chegar ao mercado, mantendo o ciclo evolutivo do parasita na população (Dorny et al., 2009). Com isso, o desenvolvimento de um teste sorológico que poderia ser empregado como um método auxiliar a inspeção *post mortem*, além de ser útil como uma ferramenta epidemiológica para rastreabilidade do parasita, contribuiria para o controle desta zoonose (Minozzo et al., 2004).

Para o diagnóstico da cisticercose suína e humana, uma das técnicas sorológicas que vem sendo usada por pesquisadores e com desempenhos de até 100% de sensibilidade e especificidade, é o immunoblot. Nessas espécies, resultados satisfatórios de testes imunológicos têm sido alcançados utilizando antígenos homólogos de larva de *Taenia solium* e heterólogos de larva de *Taenia crassiceps*, sendo que este último, além de possuir peptídeos em comum com o homólogo, facilita a obtenção e homogeneidade dos lotes dos antígenos (Tsang et al., 1991; Pathak et al., 1994; Vaz et al., 1997; Bueno et al., 2000; Pinto et al., 2001).

O immunoblot ainda é pouco utilizado no diagnóstico da cisticercose bovina, e, apesar de obterem resultados promissores, Giroto et al. (2009) ressaltaram a importância de se realizar variações no protocolo desenvolvido, além de testar outros antígenos, como o antígeno total de larva de *T. crassiceps*, com o objetivo de confirmar e verificar o desempenho desse teste para este fim.

Tendo em vista o excelente desempenho do immunoblot no diagnóstico da cisticercose suína e humana e à necessidade de se ampliar o uso do mesmo no diagnóstico da cisticercose bovina, objetivou-se avaliar a frequência e as taxas de desempenhos dos diferentes peptídeos reativos do antígeno total de larva de *T. crassiceps*, frente a diferentes categorias de soros bovinos, visando identificar aqueles que apresentam importante potencial diagnóstico para a cisticercose bovina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Antígeno

Nas análises do immunoblot foi usado antígeno total de larva de *T. crassiceps*. As larvas de *T. crassiceps* (cisticercos) foram mantidas em laboratório através da inoculação intraperitoneal em camundongos BALB/c fêmeas com 30 dias de idade de acordo com Vaz et al. (1997).

Para a produção do antígeno total, os cisticercos vivos foram coletados, congelados e, em seguida, submetidos às seguintes etapas de processamento: desidratação “overnight” por liofilização; trituração dos cisticercos liofilizados em gral de porcelana e pesagem do pó obtido; adição de solução salina 0,15M obtendo uma proporção final de 6,5 a 10% (pó); homogeneização, em banho de gelo, em homogeneizador de tecidos tipo Potter; centrifugação do material obtido a 17.400g/30min/4°C. Ao sobrenadante foi adicionado o inibidor de protease Sigma P7626 (0,25M – 10 µl/ml) (PMSF – Fluoreto de fenilmetilsufonil, Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA) e o antígeno foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

2.2. Amostras

Foram analisados pelo immunoblot 30 soros de bovinos experimentalmente infectados com 120.000 ovos de *T. saginata*, 30 soros de bovinos positivos naturais para a cisticercose, 30 soros de bovinos negativos para a cisticercose e 30 soros de bovinos sem cisticercose, mas com outras patologias, como hidatidose (12), fasciolose (12) e tuberculose (6).

Os diagnósticos foram confirmados por meio do exame anatomopatológico durante a rotina de inspeção *post mortem* realizada em Matadouros-Frigoríficos de acordo com as normas previstas nos procedimentos do Serviço de Inspeção Federal (Brasil, 1971). Entre os animais positivos para a cisticercose foram identificados bovinos com cistos viáveis, não viáveis e bovinos com cistos em ambos estágios.

2.3. Padronização das diluições dos soros e conjugado

Previamente aos ensaios de immunoblot, foram avaliados diferentes blocos de diluições seriadas (1:2) de soros (1:12,5 a 1:200) e de conjugado, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000, visando determinar o bloco que proporcione melhor contraste de reação entre soros positivos e negativos para a cisticercose. Durante esta etapa foram utilizados três soros-controle positivos, sendo um positivo experimental e dois positivos naturais, e três soros-controle negativos. Os resultados foram avaliados com base nos peptídeos reativos recomendados por Giroto et al. (2009).

2.4. Immunoblot

Os peptídeos do antígeno total de larva de *T. crassiceps*, na concentração de 40 µg, foram separados de acordo com a massa molecular por SDS-PAGE juntamente com o marcador de massa molecular S8445 de 6,5 a 200 kDa (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA). Os peptídeos, então, foram transferidos 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 “overnight” a 4°C, com voltagem de 50V e amperagem de 120mA. 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 foram lavadas com 0,05% de Tween-20 em solução salina (NaCl 0,15M) e, em seguida, foram submetidas ao imunodiagnóstico.

As tiras, dispostas em canaletas de cubas de immunoblot, 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 1:2.000, por 2 horas. Foram repetidos os procedimentos de lavagem. As reações foram reveladas com solução cromógena (diaminobenzidina 5 mg/30 ml, 0,15% H₂O₂ em PBS pH 7,2) durante 2 minutos, evidenciando os peptídeos reativos em cada tira. A reação, então, foi interrompida com água destilada e as tiras foram secadas em papel filtro. 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.

2.5. Análise dos resultados

As tiras foram escaneadas e analisadas pelo programa Quantity One, versão 4.6 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), a partir da identificação das bandas do marcador de massa molecular.

Com a identificação das bandas reativas, foram determinadas as taxas de desempenho de cada peptídeo de acordo com a frequência de suas reações, utilizando as diferentes categorias de soro-controle. Foram determinadas as taxas de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia, visando identificar os peptídeos de maior importância diagnóstica para a cisticercose bovina e, conseqüentemente, os critérios de positividade e negatividade para o teste.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Diluições dos soros e conjugado

O bloco de diluições de soros e conjugado que permitiu a melhor visualização das bandas reativas nas tiras com amostras positivas e melhor diferenciação entre as tiras de soros positivos e negativos, foi o de 1:100 para o soro e de 1:2.000 para o conjugado. Este bloco foi adotado na realização dos ensaios de immunoblot.

Giroto et al. (2009), também no diagnóstico da cisticercose bovina, verificaram como melhor bloco de diluições de soros e conjugado, 1:25 e 1:2.000, respectivamente.

A diluição de soro utilizada neste trabalho quando comparada a usada por Giroto et al. (2009) apresenta a vantagem de necessitar de uma quantidade menor de soro, o que contribui para uma economia de soros-controle e também favorece o uso do teste quando não se possui grande quantidade de soro.

Pinto et al. (2001) ao realizarem a titulação em bloco de diluições de soros-controle e conjugado, encontraram como melhor combinação o bloco de 1:100 de soro e 1:1.000 de conjugado, uma vez que proporcionou maior diferença entre soros positivos e negativos para a cisticercose suína. Ainda, no diagnóstico da cisticercose suína, Pathak et al. (1994) também utilizaram 1:100 na diluição dos soros utilizados no immunoblot.

Já a diluição de 1:2.000 apresenta como vantagem sobre a de 1:1.000, usada nos protocolos de cisticercose suína, a economia deste reagente, diminuindo então o custo do teste.

3.2. Immunoblot

A Tabela 1 exemplifica a frequência de cada peptídeo reativo no immunoblot de acordo com a categoria de soro bovino utilizada.

Tabela 1. Frequência de reação dos peptídeos no immunoblot em cada categoria de soro, utilizando antígeno total de larva de *T. crassiceps*.

Peptídeo (kDa)	Categoria de soro			
	Positivos experimentais	Positivos naturais	Negativos	Outras patologias
182-184	0	1	2	0
179	0	0	1	0
161-168	0	3	4	1
144-151	3	8	3	0
129-143	9	20	0	3
110-127	24	30	18	15
106-109	13	12	11	3
99-105	30	20	9	12
96-98	7	10	0	12
94-95	4	2	3	12
93	3	9	0	4
91-92	5	5	1	3
86-90	14	15	15	13
81-85	20	19	17	16
80	3	4	0	3
76-79	16	8	9	13
71-75	13	14	20	14
70	5	3	0	1
66-69	10	14	12	8
61-65	20	6	11	10
54-60	21	17	13	15
52-53	14	4	1	5
48-51	14	8	14	7
46-47	9	8	1	3
40-45	19	12	10	12
34-39	28	30	23	17
32-33	7	6	0	0
29-31	30	24	19	16
25-28	12	10	18	17
21-23	7	4	0	2
14-19	19	11	1	3
9-13	5	7	2	0
6-8	30	20	0	1
Total	414	364	238	241

Pode ser observado que os soros de bovinos positivos para a cisticercose apresentaram maior quantidade de peptídeos reativos (414 e 364) que os bovinos negativos (238) e com outras patologias (241), sendo que amostras negativas apresentaram menor número de reações que as amostras de bovinos com outras patologias. Este fato também foi observado por Pinto et al. (2001) ao utilizarem as mesmas categorias de soros de suínos no immunoblot para o diagnóstico da cisticercose suína.

Ainda, entre os soros positivos, os animais com infecção experimental apresentaram maior número de peptídeos reativos que os animais naturalmente infectados. Já Giroto (2007) encontrou o resultado oposto ao

observado neste trabalho, com os soros de bovinos naturalmente infectados com ovos de *T. saginata* apresentando o maior número de peptídeos reativos.

Levando em consideração apenas os peptídeos considerados importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina, com valores de acurácia acima de 70,0% (Tabela 2), observa-se o mesmo comportamento em relação ao número total de peptídeos: os bovinos positivos experimentais apresentaram maior número de peptídeos reativos (93), seguido pelos bovinos positivos naturais (78), bovinos com outras patologias (20) e, por último, os bovinos negativos para a cisticercose (12) (Tabela 1). Girotto (2007) verificou o mesmo comportamento entre os soros positivos, porém os animais negativos apresentaram maior número de peptídeos reativos que os animais com outras patologias, que por sua vez não apresentaram reações com peptídeos específicos.

De acordo com a Tabela 1, pode-se verificar também que nenhum peptídeo reagiu com todas as amostras de soros positivos, o que coincide com os resultados observados por outros pesquisadores em estudos da cisticercose bovina (Girotto et al., 2009), suína (Tsang et al., 1991) e humana (Tsang et al., 1989; Vaz et al., 1997). Além disso, a produção de anticorpos contra os diversos peptídeos reativos variou no número e na intensidade, confirmando a heterogeneidade da resposta imune do hospedeiro contra o parasita (Vaz et al., 1997).

A Tabela 2 contém as taxas de desempenho de cada peptídeo reativo, calculadas com base na frequência nas diferentes categorias de soro.

Tabela 2. Taxas de desempenho dos peptídeos reativos no imunoblot, utilizando antígeno total de larva de *T. crassiceps*.

Peptídeo (kDa)	Taxas de desempenho (%)				
	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo	Acurácia
182-184	1,7	96,7	33,3	49,6	49,2
179	0,0	98,3	0,0	50,4	49,2
161-168	5,0	91,7	37,5	49,1	48,3
144-151	18,3	95,0	78,6	53,8	56,7
129-143	48,3	95,0	90,6	64,8	71,7
110-127	90,0	45,0	62,1	81,8	67,5
106-109	41,7	76,7	64,1	56,8	59,2
99-105	83,3	65,0	70,4	79,6	74,2
96-98	28,3	80,0	58,6	52,7	54,2
94-95	10,0	75,0	28,6	45,5	42,5
93	20,0	93,3	75,0	53,8	56,7
91-92	16,7	93,3	71,4	52,8	55,0
86-90	48,3	53,3	50,9	50,8	50,8
81-85	65,0	45,0	54,2	56,3	55,0
80	11,7	95,0	70,0	51,8	53,3
76-79	40,0	63,3	52,2	51,4	51,7
71-75	45,0	43,3	44,3	44,1	44,2
70	13,3	98,3	88,9	53,2	55,8
66-69	40,0	66,7	54,5	52,6	53,3
61-65	43,3	65,0	55,3	53,4	54,2
54-60	63,3	53,3	57,6	59,3	58,3
52-53	30,0	90,0	75,0	56,3	60,0
48-51	36,7	65,0	51,2	50,6	50,8
46-47	28,3	93,3	81,0	56,6	60,8
40-45	51,7	63,3	58,5	56,7	57,5
34-39	96,7	33,3	59,2	90,9	65,0
32-33	21,7	100,0	100,0	56,1	60,8
29-31	90,0	41,7	60,7	80,6	65,8
25-28	36,7	41,7	38,6	39,7	39,2
21-23	18,3	96,7	84,6	54,2	57,5
14-19	50,0	93,3	88,2	65,1	71,1
9-13	20,0	96,7	85,7	54,7	58,3
6-8	83,3	98,3	98,0	85,5	90,8

Um método diagnóstico dicotômico, capaz de detectar presença ou ausência da doença como o desenvolvido neste trabalho, deve apresentar como característica: sensibilidade e especificidade satisfatórias, com valores equilibrados. Sendo assim, o critério adotado na identificação de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina foi a acurácia, que por sua vez reflete a capacidade de cada peptídeo fornecer o diagnóstico correto, englobando os resultados de sensibilidade e especificidade.

Considerando uma acurácia mínima de 70,0% no teste, quatro intervalos de peptídeos definidos nesta pesquisa destacaram-se entre os demais com os melhores resultados de reação: 6-8, 14-19, 99-105 e 129-143 kDa (Tabela 2).

O valor de acurácia mais elevado foi encontrado nos peptídeos de baixa massa molecular, 90,8% para os peptídeos de 6-8 kDa; os peptídeos de 14-19 kDa, de baixa massa molecular, também obtiveram alta acurácia, 71,1%. Já os de alta massa molecular obtiveram 74,2% e 71,7% para os peptídeos de 99-105 kDa e 129-143 kDa, respectivamente. Estes peptídeos podem ser considerados os mais importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina, uma vez que foram os mais eficientes em diferenciar soros de bovinos positivos e negativos para a cisticercose. Embora os peptídeos de 9-13 kDa não se agrupassem entre os de maior acurácia (58,8%), tais peptídeos acusaram alto poder de diferenciação das amostras positivas das amostras de reações cruzadas ou inespecíficas, mostrando uma especificidade de 96,7%, o que contribui para reafirmar a importância do imunoblot como um método diagnóstico confirmatório da cisticercose bovina.

Giroto et al. (2009) também destacaram a importância dos peptídeos de baixa massa molecular do antígeno de larva de *T. crassiceps* no diagnóstico da cisticercose bovina, principalmente os de 4-6, 14 e 18 kDa, que apresentaram valores de acurácia acima de 80,0%, confirmando os resultados obtidos neste trabalho. No entanto, segundo estes mesmos autores, os peptídeos de 100-106 kDa apresentaram baixo valor de acurácia (55,6%), possuindo, portanto, baixo potencial diagnóstico e confrontando os resultados obtidos. Brandt et al. (1992), utilizando antígeno de larva de *T. saginata*, verificaram a importância diagnóstica do peptídeo de 100 kDa, enquanto Vicentini-Oliveira et al. (2010), além do peptídeo de 100 kDa, destacaram os peptídeos de baixa massa molecular (<18 kDa) como importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina, ambos concordando com os resultados obtidos neste estudo.

Em outra linha de pesquisa, porém coincidindo com os resultados deste trabalho, Pinto et al. (2001) obtiveram um padrão similar no imunoblot para o diagnóstico da cisticercose suína, com os peptídeos de baixa massa molecular (<25 kDa) do antígeno total de *T. crassiceps* entre os de maior importância para o diagnóstico da cisticercose suína. No entanto, os mesmos autores consideraram os peptídeos de alta massa molecular pouco específicos para o diagnóstico da cisticercose suína, o mesmo não ocorreu nesta pesquisa uma vez que os peptídeos de 99-105 e 129-143 kDa apresentaram elevado valor de acurácia para o diagnóstico da cisticercose bovina.

Ainda, concordando com os resultados deste trabalho, Ito et al. (1998) e Ito et al. (1999) destacaram a importância dos peptídeos de 10 e 26 kDa no diagnóstico da cisticercose humana e suína, respectivamente. Já Macedo et al. (2002), Pardini et al. (2002) e Peralta et al. (2010) obtiveram resultados satisfatórios para a cisticercose humana, sendo os peptídeos de 14 e 18 kDa altamente sensíveis e específicos. Gottstein et al. (1987) relataram a especificidade de outro peptídeo de baixa massa molecular também no diagnóstico da cisticercose humana, o de 8 kDa.

Tsang et al. (1989) e Tsang et al. (1991), identificaram sete glicoproteínas do antígeno de *T. solium* específicas para o diagnóstico da cisticercose humana e suína, respectivamente, sendo que entre estes peptídeos estão os de 13, 14 e 18 kDa. Ainda, Tsang et al. (1989) observaram que proteínas com massa molecular menor que 13 kDa também foram reconhecidas pela maioria dos pacientes com cisticercose.

Como pôde ser observado diversos autores relataram a imunodominância dos peptídeos de baixa massa molecular na cisticercose suína e humana e, agora, confirmando os resultados de Giroto et al. (2009) e Vicentini-Oliveira et al. (2010), também na cisticercose bovina.

As reações de animais negativos observadas com estes peptídeos considerados importantes no diagnóstico da cisticercose bovina podem ser em decorrência de resposta inespecífica, uma vez que estes bovinos foram criados a campo, em condições onde estavam expostos a diversos patógenos, ocasionando alguma resposta imune inespecífica nestes animais.

Já as reações cruzadas com estes peptídeos principais ocorreram somente com soros de fasciolose e hidatidose; soros de animais com tuberculose não reagiram com estes peptídeos. Pinto et al. (2001) também verificaram reação cruzada com hidatidose no imunoblot para o diagnóstico da cisticercose suína. Essas reações podem ser consequência da sobreposição antigênica existente entre cestóides e outros parasitas (Smith et al., 1990).

Apesar da ocorrência de reações cruzadas com os peptídeos de valor diagnóstico, a frequência observada foi baixa, principalmente com os peptídeos de baixa massa molecular, confirmando a especificidade do teste e a importância de se levar em consideração os peptídeos corretos para o diagnóstico da cisticercose bovina (Tabela 1). Com os peptídeos de 9-13 kDa

não houve reação cruzada e com os de 6-8 kDa ocorreu apenas uma reação, em um bovino portador de fasciolose. Já com os peptídeos de 14-19 kDa, foram observadas três reações cruzadas, sendo duas com soros de fasciolose e uma com soro de hidatidose. Com os peptídeos de 129-143 kDa também foram observadas três reações cruzadas, no entanto duas com soros de fasciolose e uma com soro de hidatidose. Os peptídeos de 99-105 kDa, foram os responsáveis por maior número de reações cruzadas entre os peptídeos importantes, com 12 no total, sendo sete com soros de fasciolose e cinco com soros de animais com hidatidose.

Diversos peptídeos reativos obtiveram um baixo valor de acurácia, uma vez que apresentaram taxas de sensibilidade e especificidade discrepantes entre si, seja por reagirem tanto com soros positivos, negativos e com outras patologias, ou por não reagirem com soros positivos; são estes os peptídeos de 21-23 a 96-98 kDa, 106-109 a 110-127 kDa e 144-151 a 182-184 kDa. Por este motivo, foram considerados de baixo valor diagnóstico, pois a presença somente destes peptídeos não é capaz de confirmar o resultado para a cisticercose bovina.

A interpretação correta dos resultados do imunoblot depende quase que totalmente da identificação correta das bandas com poder diagnóstico. No entanto, além da massa molecular dessas bandas, também é importante verificar a aparência física (largura) das mesmas (Larralde et al., 1989; Tsang et al., 1989). A Figura 1 ilustra as tiras características para cada categoria de soro analisada.

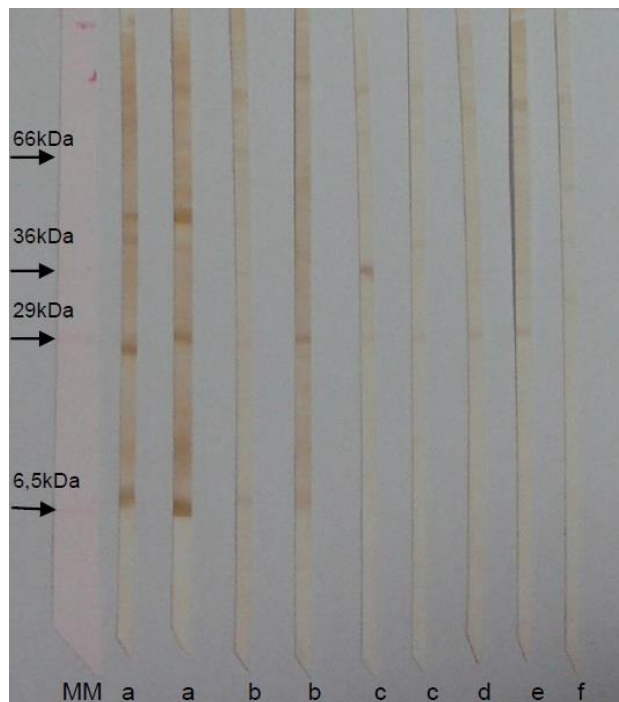


Figura 1. Padrões de bandas reativas nas diferentes categorias de soros utilizadas nos ensaios de imunoblot: *MM*, marcador de massa molecular; *a*, positivos experimentais; *b*, positivos naturais; *c*, negativos para a cisticercose bovina; *d*, hidatidose; *e*, fasciolose; *f*, tuberculose.

As bandas de baixa massa molecular apresentaram-se em forma de bandas largas, assemelhando-se a manchas evidenciadas nas tiras. Em algumas reações estas manchas mostravam coloração mais intensa do que em outras, provavelmente pela variação da quantidade de anticorpos produzidos entre os hospedeiros (Tsang et al., 1991). A banda de 29 kDa, bastante frequente nas diferentes categorias de soros, se apresentou em forma de linha, porém mais espessa e de coloração mais intensa que as demais. Já as bandas de massas moleculares superiores a esta se apresentaram em formas de linhas finas, podendo, no entanto, serem confundidas com manchas por algumas vezes estarem muito próximas umas das outras; ainda, a coloração variou entre intensa e clara. Padrões de bandas semelhantes foram observados por Giroto et al. (2009).

Na Figura 1, pode-se visualizar também como os peptídeos de baixa massa molecular são frequentes em amostras positivas e praticamente ausentes nas amostras negativas e de outras patologias, ilustrando visualmente a importância dos mesmos no diagnóstico da cisticercose bovina e facilitando a leitura das reações em rotina laboratorial.

Outro ponto importante em um teste diagnóstico é a determinação se uma amostra é positiva ou negativa. Nesta questão, Tsang et al. (1989)

estabeleceram como critério de positividade, a reação da amostra com pelo menos um dos peptídeos de importância diagnóstica. Já Pinto et al. (2001) para considerarem uma amostra positiva, esta teria que ser reativa com pelo menos dois peptídeos considerados específicos. O primeiro critério contribui para o aumento da sensibilidade do teste, enquanto o segundo favorece a especificidade, logo o critério de positividade a ser adotado depende do objetivo da pesquisa ou do diagnóstico (Pinto et al., 2001).

Portanto, ao determinar a positividade e a negatividade de uma amostra para a cisticercose bovina através do immunoblot, deve-se levar em conta a reatividade de um ou mais dos seguintes peptídeos: 6-8, 14-19, 99-105 ou 129-143 kDa, com base nos resultados obtidos neste trabalho.

4. CONCLUSÃO

O antígeno total de larva de *Taenia crassiceps* possui peptídeos com alto valor diagnóstico para a cisticercose bovina, sendo que o desempenho favorável obtido com os peptídeos de baixa massa molecular reafirma o seu poder diagnóstico anteriormente verificado no diagnóstico da mesma doença em suínos e humanos.

Estes resultados credenciam o immunoblot como um método de diagnóstico confiável para a cisticercose bovina, o que irá contribuir para um controle mais eficiente da doença, uma vez que o mesmo é capaz de diferenciar entre bovinos positivos e negativos, com altas taxas de desempenho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDT, J.R.A.; GEERTS, S.; DE DEKEN, R.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; BRIJS, L.; FALLA, N. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **International Journal for Parasitology**, v.22, n.4, p.471-477, 1992.

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

BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; MIELLE, S.R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.1, p.146-151, 2000.

CARVALHO, L.T.; COSTA, R.F.R.; SANTOS, I.F.; CARVALHO, A.L.T. Prevalência de cisticercose em bovinos abatidos em matadouro-frigorífico sob inspeção federal em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, n.2, p.109-112, 2006.

DORNY, P.; PRAET, N.; DECKERS, N.; GABRIEL, S. Emerging food-borne parasites. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.196-206, 2009.

DUTRA, L.H.; GIROTTO, A.; VIEIRA, R.F.C.; VIEIRA, T.S.W.J.; ZANGIROLAMO, A.F.; MARQUÊS, F.A.C.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO, O. The prevalence and spatial epidemiology of cysticercosis in slaughtered cattle from Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.5, p.1887-1896, 2012.

GIROTTO, A. **Avaliação do imunoblot no diagnóstico da cisticercose bovina**, 2007. 74f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

GIROTTO, A.; PINTO, P.S.A.; DIAS, J.C.O.; CHAVES, L.S.; FERREIRA, H.C.C. Detecção de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina no imunoblot. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1147-1151, 2009.

GOTTSTEIN, B.; ZINI, D.; SCHANTZ, P.M. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.38, p.299-303, 1987.

ITO, A.; PLANCARTE, A.; MA, L.; KONG, Y.; FLISSER, A.; CHO, S.Y.; LIU, Y.L.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M.W.; SCHANTZ, P.M. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. **American Journal for Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, n.2, p.291-294, 1998.

ITO, A.; PLANCARTE, A.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; IKEJIMA, T.; PIAO, Z.X.; KANAZAWA, T.; MARGONO, S.S. ELISA and immunoblot using purified glycoproteins for serodiagnosis of cysticercosis in pigs naturally infected with *Taenia solium*. **Journal of Helminthology**, v.73, n.4, p.363-365, 1999.

LARRALDE, C.; MONTOYA, R.M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T.; COLTORTI, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **American Journal for Tropical Medicine and Hygiene**, v.40, n.3, p.282-290, 1989.

MACEDO, H.W.; PERALTA, R.H.S.; CIPRIANO, A.; SARMENTO, M.R.; VAZ, A.J.; PERALTA, J.M. Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.2, p.93-103, 2002.

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

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

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

PERALTA, R.H.; ESPÍNDOLA, N.M.; PARDINI, A.X.; IHA, A.H.; MOURA, H.; BARR, J.R.; VAZ, A.J.; PERALTA, J.M. *Taenia crassiceps* cysticerci: Characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Experimental Parasitology**, v.124, p.295-300, 2010.

PINTO, P.S.A.; VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; GERMANO, P.M.L. Immunoblot analysis using antigen from *Taenia crassiceps* cysticerci in the diagnosis of swine cysticercosis. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.56, n.36-42, 2001.

SMITH, H.J.; SNOWDON, K.E.; GREGORY, D.; FINLEY, G.G. Assessment of an enzyme-linked Immunosorbent assay using a *Taenia hydatigena* fraction antigen in the diagnosis of cysticercosis in cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.54, n.2, p.299-300, 1990.

TOWBIN, H.; STAHELIN, 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.

TSANG, V.C.W.; BRAND, J.A.; BOYER, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **The Journal of Infectious Diseases**, v.159, n.1, p.50-59, 1989.

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

VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.F.; LIVRAMENTO, J.A.; SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M.; FERREIRA, W. 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.

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C.; GOLIM, M.A.; PAULAN, S.C.; BIONDI, G.F.; ROSSI-FERREIRA, R.; DEFFUNE, E.; NUNES, C.M. *Taenia saginata*: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia*

saginata metacestode antigens. **Experimental Parasitology**, v.126, p.621-625, 2010.

CONCLUSÃO GERAL

Os antígenos heterólogos de larva de *T. crassiceps* apresentaram bons resultados em ambos os testes desenvolvidos neste estudo, o que facilita a realização destes ensaios laboratoriais, pois são de fácil manutenção e preparo. No ELISA destacaram-se os antígenos de membrana e total em relação ao de líquido vesicular, provavelmente pelo perfil de peptídeos apresentados na caracterização por SDS-PAGE, onde o antígeno de líquido vesicular apresentou menor quantidade de peptídeos, principalmente os de baixa massa molecular.

Entre as substâncias bloqueadoras avaliadas no ELISA, a que proporcionou maior diferenciação entre soros positivos e negativos para a cisticercose foi o leite em pó desnatado a 5%, com resultados bastante superiores em relação às demais. As concentrações de antígenos definidas foram 10 µg/ml e 40 µg/ml, as diluições do conjugado foram 1:1.250 e 1:2.500, e a diluição de soro foi 1:100. Estes dados reforçam a necessidade de se combinar os melhores parâmetros para aumentar a confiabilidade do teste diagnóstico.

O ELISA indireto utilizando antígenos de larva de *Taenia crassiceps*, depois de padronizado de acordo com as melhores combinações de suas variáveis analíticas, mostrou ser um teste com sensibilidade satisfatória, até mesmo para animais naturalmente infectados. Porém apresentou dificuldade em diferenciar bovinos com cisticercose de bovinos com outras patologias.

Através do immunoblot, foram identificados peptídeos de alta (99-105 e 129-143 kDa) e baixa (6-8 e 14-19 kDa) massa molecular com alto valor diagnóstico para a cisticercose bovina, que apresentaram valores de sensibilidade e especificidade satisfatórios e, conseqüentemente, alta acurácia do diagnóstico. Ainda, os peptídeos de baixa massa molecular (6-8, 9-13 e 14-19 kDa) apresentaram os maiores valores de especificidade e perfis de bandas característicos, em forma de manchas, destacando-se em relação às demais e facilitando a identificação para diagnóstico.

Sendo assim, o ELISA por ser sensível poderia ser associado com os procedimentos de inspeção *post mortem* como um método de diagnóstico auxiliar, contribuindo para a destinação correta das carcaças infectadas, uma

vez que seria um procedimento complementar, aumentando a sensibilidade do diagnóstico da cisticercose bovina.

Outra perspectiva seria o uso de ambos os testes sorológicos para estudos epidemiológicos da cisticercose bovina, identificando áreas de foco da doença e direcionando medidas de controle. Em decorrência da alta sensibilidade, o ELISA seria utilizado como teste de triagem, identificando o maior número de animais positivos, associando-se ao immunoblot como diagnóstico confirmatório, reduzindo o número de resultados falso-positivos, devido a alta especificidade dos peptídeos identificados como importantes.