

AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE* NO IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE HUMANA PELA HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA

E. NASCIMENTO (1) e W. MAYRINK (1)

RESUMO

Os Autores avaliaram os antígenos de *Cysticercus cellulosae* para o imunodiagnóstico da cisticercose humana pela reação de hemaglutinação indireta. Observaram que os antígenos de escólex (ES) e ES pico II são mais específicos que os antígenos de *C. cellulosae* total (CC), líquido vesicular e de membrana (ME). Usando soros de pacientes com cisticercose comprovada parasitologicamente, obtiveram uma sensibilidade de 0,80 para o ES, 0,84 para o ES II e especificidade 1,0, quando os soros foram usados na diluição 1:8 para o antígeno ES e 1:16 para o antígeno ES II.

INTRODUÇÃO

No imunodiagnóstico da cisticercose humana são conhecidas as dificuldades para se detectar anticorpos anti-cisticercos; a pesquisa de anticorpos no líquido cefalorraqueano (LCR) é de grande utilidade no diagnóstico da neurocisticercose, entretanto a mesma pesquisa no soro seria facilitada devido a sua fácil obtenção em relação ao LCR que é obtido através da punção medular.

Empregando extrato total de *Cysticercus cellulosae* e a reação de hemaglutinação indireta (HI) para detectar anticorpos circulantes anti-cisticercos, BIAGI & col.¹, encontraram uma positividade de 92% em 13 soros de pacientes com cisticercose comprovada. PROCTOR & col.¹¹, utilizando a mesma técnica e antígeno de *C. cellulosae* extraído em solução salina, encontraram 85% de positividade em 48 soros de pacientes com cisticercose comprovada e 17% em soros de pacientes com teníase por *Taenia solium* ou *T. saginata*.

POWELL & col.¹⁰ usando como antígeno o extrato total de *C. cellulosae* e a HI para o

diagnóstico da cisticercose, concluíram ser esse método de grande valor na detecção de anticorpos anti-cisticercos na forma assintomática e na epilepsia associada a cisticercose.

Estudos recentes sobre o relacionamento entre antígenos do *C. cellulosae* e da *T. solium*, através de imune soros, demonstraram a existência de componentes comuns entre os antígenos do *C. cellulosae* e da *T. solium* (NASCIMENTO & ARAÚJO⁸).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a especificidade e a sensibilidade dos antígenos de *C. cellulosae* para o imunodiagnóstico da cisticercose humana pela hemaglutinação indireta.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígenos — Os *Cysticercus cellulosae* (CC) foram obtidos do coração, língua e músculos esqueléticos de suínos naturalmente infectados. Após serem retirados dos músculos, os cisticercos foram lavados em banhos sucessi-

(1) Trabalho realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), no Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 2486, 30.000 — Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

vos de água destilada e de solução salina tamponada com fosfato (SST) 0,15 M pH 7,2. Parte dos cisticercos íntegros foi liofilizada e parte foi separada em membrana (ME) e escólex (ES) com auxílio de bisturi e microscópio estereoscópico.

O antígeno de líquido vesicular (LI) foi colhido diretamente das vesículas com auxílio de uma seringa adaptada com agulha 15x10. As partes do *C. cellulosae*: ME, ES, LI e o CC total foram liofilizadas, sendo a extração dos antígenos realizada segundo método descrito por NASCIMENTO & ARAÚJO⁷.

A padronização da concentração protéica dos antígenos foi feita de acordo com o método descrito por LOWRY & col.⁶

Soros dos pacientes — Os soros dos pacientes com neurocisticercose comprovada por cirurgia foram obtidos no Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, enquanto que os demais soros de pacientes com teníase (*T. solium* ou *T. saginata*), ancilostomose, esquistossomose, ascariíase, tricocefalose, es-trongiloidose e doença de Chagas foram obtidos no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Como padrões negativos foram usados soros de recém-nascidos Norte-Americanos, obtidos na divisão de alergia, imunologia e doenças infecciosas da Palo Alto Medical Research Foundation, Palo Alto, Califórnia, USA. Todos os soros foram diluídos inicialmente a 1:4 em SSL.

Fracionamento de antígenos — As frações dos antígenos ES e LI usadas no presente trabalho foram obtidas como descrita por NASCIMENTO & ARAÚJO⁸.

Hemaglutinação indireta — Foi executada usando-se placas tipo V, segundo NASCIMENTO & ARAÚJO⁸. Os eritrócitos humanos, O Rh negativos, foram fixados pelo formaldeído segundo BUTLER³, HOSHINO-SHIMIZU & col.⁵. Na sensibilização dos eritrócitos foram usados 3 ml de uma suspensão de células a 10%, para cada antígeno. Inicialmente, as células foram lavadas por centrifugação a 1000 g, cinco vezes com 10 ml cada vez de solução de NaCl a 0,85%, durante três minutos. O sedimento de eritrócitos foi ressuspensão em 10 ml de PBS pH 7,2 contendo ácido tânico a 1:15000 e incu-

bado em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos. Em seguida as células foram lavadas por centrifugação, cinco vezes em solução salina. O sedimento foi ressuspensão em 10ml de PBS pH 6,4, contendo um antígeno de cada na concentração de 150 microgramas de proteínas por mililitro e incubação por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, os eritrócitos foram novamente lavados cinco vezes em solução salina contendo 1% de soro normal, inativado, de coelho. Finalmente os eritrócitos foram ressuspensos a 1% em solução estabilizadora preparada segundo HOSHINO-SHIMIZU & col.⁵ e conservados a 4°C. Vinte e cinco microlitros do antígeno foram gotejados em cada orifício da placa contendo 50 microlitros da diluição dos soros e a placa em seguida agitada por 30 segundos em vibrador (Mixtron, Toptronix, Brasil). A leitura foi realizada após duas horas à temperatura ambiente.

Sensibilidade e especificidade — Os cálculos desses índices foram feitos de acordo com BUCK & GART².

RESULTADOS

Anticorpos anti-cisticercos foram detectados pelos antígenos CC, ES, ES II, LI, LI II e ME até nas diluições de soros de 1:512 ou 1:1024, de pacientes com cisticercose comprovada (Tabela I). Foram observadas reações cruzadas com teníase por *T. solium* ou *T. saginata* nas diluições de soro de até 1:32 com antígeno CC, 1:8 com antígeno ES, 1:64 com antígeno ES II, 1:16 com antígeno LI e 1:8 com antígeno ME (Tabela I). Para pacientes com ascariíase, tricocefalose, esquistossomose e sífilis foram observadas reações cruzadas com soros puros ou diluídos até 1:8, com os antígenos CC, ES II e LI II.

As diluições dos soros nos quais as reações de hemaglutinação mostrou especificidade máxima (índice 1,0) variaram segundo os diferentes antígenos e corresponderam a diferentes índices de sensibilidade. Estes dados estão reunidos na Tabela II.

DISCUSSÃO

Em geral a reação de hemaglutinação indireta para cisticercose é considerada como a técnica mais sensível do que algumas reações de precipitação e mesmo em relação à fixação

T A B E L A I

Avaliação comparativa de antígenos de *Cysticercus cellulosae* e soros de pacientes com cisticercose, teníases e outras parasitoses

Antígenos	Doenças	Títulos na Hemaglutinação Indireta									Total de Soros	
		<4	4	8	16	32	64	128	256	512		1024
CC	Cisticercose	4	4	5	4	3	-	2	-	2	1	25
	Teníases:											
	<i>T. solium</i>	7	7	5	-	3	-	-	-	-	-	22
	<i>T. saginata</i>	8	2	2	-	-	-	-	-	-	-	12
	Outras	57	22	4	-	-	-	-	-	-	-	83
ES	Cisticercose	1	9	4	3	-	3	-	-	2	3	25
	Teníases:											
	<i>T. solium</i>	11	9	2	-	-	-	-	-	-	-	22
	<i>T. saginata</i>	9	2	1	-	-	-	-	-	-	-	12
	Outras	80	3	-	-	-	-	-	-	-	-	83
ES II	Cisticercose	2	9	-	2	4	2	1	-	-	5	25
	Teníases:											
	<i>T. solium</i>	9	1	5	1	3	3	-	-	-	-	22
	<i>T. saginata</i>	3	-	2	1	1	5	-	-	-	-	12
	Outras	79	3	1	-	-	-	-	-	-	-	83
LI	Cisticercose	6	7	-	7	2	1	-	-	-	-	25
	Teníases:											
	<i>T. solium</i>	16	5	-	1	-	-	-	-	-	-	22
	<i>T. saginata</i>	11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	12
	Outras	79	4	-	-	-	-	-	-	-	-	83
LI II	Cisticercose	7	8	-	5	1	1	1	-	1	1	25
	Teníases:											
	<i>T. solium</i>	7	6	6	3	-	-	-	-	-	-	22
	<i>T. saginata</i>	1	3	5	3	-	-	-	-	-	-	12
	Outras	79	3	1	-	-	-	-	-	-	-	83
ME	Cisticercose	10	8	-	4	-	-	1	-	2	-	25
	Teníases:											
	<i>T. solium</i>	17	5	-	-	-	-	-	-	-	-	22
	<i>T. saginata</i>	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
	Outras	81	2	-	-	-	-	-	-	-	-	83

Soros de pacientes com outras parasitoses (83): Doença de Chagas (10), Esquistossomose (7), Tricocefalose (7), Ancilostomose (4), Estrongiloidose (2), Ascariidíase (6) e soros padrões negativos (22)

de complemento (BIAGI & col.¹; PROCTOR & col.¹¹). No entanto, através dessa técnica ainda são observados resultados falso-positivos, provavelmente devido ao uso de antígenos não padronizados.

Reações cruzadas com o antígeno CC total foram observadas em soros de pacientes portadores de teníase, sífilis e outras parasitoses (Tabela I). Isto também aconteceu com os demais antígenos, mas em menor proporção. Tais

T A B E L A II
Índices de sensibilidade e especificidade dos antígenos CC, ES, ES II, LI, LI II e ME em relação às diluições dos soros de pacientes portadores de cisticercose, soros de pacientes padrões negativos e com outras parasitoses

Antígenos	Índices	Títulos de hemaglutinação indireta									
		4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
CC	Sensibilidade	0,84	0,64	0,48	0,36	0,36	0,28	0,28	0,20	0,16	
	Especificidade	0,79	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
ES	Sensibilidade	0,96	0,80	0,68	0,68	0,56	0,56	0,56	0,48	0,36	
	Especificidade	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
ES II	Sensibilidade	0,92	0,92	0,84	0,68	0,60	0,56	0,56	0,56	0,36	
	Especificidade	0,96	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
LI	Sensibilidade	0,76	0,76	0,48	0,40	0,36	0,36	0,36	0,32	0,28	
	Especificidade	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
LI II	Sensibilidade	0,72	0,72	0,52	0,48	0,44	0,40	0,40	0,36	0,32	
	Especificidade	0,96	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
ME	Sensibilidade	0,60	0,60	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,32	0,32	
	Especificidade	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	

Total de soros usados (108): Pacientes com doença de Chagas (10), Esquistossomose (7), Tricocefalose (7), Ancilostomose (4), Estromboliose (2), Ascariíase (6), Cisticercose (25) e soros padrões negativos (22)

dados confirmam os resultados obtidos por NASCIMENTO & ARAÚJO⁸ usando imune soros frente a antígenos de *C. cellulosae* e *T. solium*. Reações cruzadas, sempre com títulos menores do que 1:8, também, foram observadas em soros de pacientes com sífilis, ascariídase, tricocefalose e esquistossomose mansônica. Nas diluições de soros em que não mais se observaram tais reações cruzadas, os antígenos CC, LI, LI II e ME apresentaram índices de sensibilidade 0,48, 0,76, 0,52, 0,60 (Tabela II).

Diluições discriminantes a 1:8 dos soros para o antígeno ES e 1:16 para o ES II devem ser usadas e não a 1:64 como preconizada por NAHAJAN & col.⁹, porque julgamos que diluições abaixo de 1:8 diminuem a especificidade e acima desse título podem levar a resultados falso-negativos com os nossos antígenos; possivelmente, devido a presença no soro de pequena concentração de anticorpos circulantes anti-cisticercos ou que a maior reatividade imunológica dos pacientes esteja relacionada com a localização, viabilidade e ou com o número de cisticercos no organismo. Tal hipótese foi também proposta por HERBERT & OBERG⁴, na cisticercose suína.

Com o extrato total de *C. cellulosae* foi obtida uma sensibilidade de 0,84 e uma especificidade de 0,79 em 25 soros de pacientes com cisticercose, diluídos a 1:4 (Tabela II). BIAGI & col.¹ observaram uma positividade de 92% em 13 soros testados e PROCTOR & col.¹¹ encontraram anticorpos em 85% dos 48 soros testados.

Os antígenos ES e ES II foram os mais específicos para detectar anticorpos anti-cisticercos. Para uma especificidade de 1,0 foi observada sensibilidade 0,80 com antígenos ES, na diluição 1:8 dos soros e 0,84 com antígeno ES II, na diluição 1:16 dos soros. Usando o antígeno ES e soros diluídos a 1:8 foi observado menor número de reações cruzadas com teníase, do que para o antígeno ES II, mesmo usando soros diluídos a 1:16. Tal fato, possivelmente seja devido a existência de maior concentração de componentes antigênicos comuns entre o ES II e as tênias. Pelos resultados obtidos estamos convencidos de que os antígenos ES e ES II deverão ser usados na detecção de anticorpos no soro de pacientes com cisticercose pela hemaglutinação indireta.

SUMMARY

Evaluation of antigens from *Cysticercus cellulosae* for immunodiagnosis of human cysticercosis by haemagglutination test

The Authors evaluated the use of antigens from *Cysticercus cellulosae* in the immunodiagnosis of human cysticercosis by haemagglutination test. The extract prepared from the escolex and its chromatographic peak II were more specific than those from whole larvae, vesicular liquid and membrane antigens. Using sera from patients with parasitologically proven cysticercosis, positive reactions were obtained with a sensitivity index of 0.80 for escolex antigen and 0.84 escolex peak II antigen. Specificity of 1.0 was obtained for sera diluted at 1:8 for ES and 1:16 for ES II antigens.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIAGI, F. F.; NAVARRETE, F.; PINA, A.; SANTIAGO, A. M. & TAPIA, L. — Estudio de tres reacciones serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis. *Rev. Med. Hosp. General Mexico* II: 501-508, 1961.
2. BUCK, A. A. & GART, J. J. — Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. *Am. J. Epidemiol.* 83: 586-592, 1965.
3. BUTLER, W. T. — Hemagglutination studies with formalinized erythrocytes. Effect of bis-diazo-benzidine and tannic acid treatment on sensitization by soluble antigen. *J. Immunol.* 90: 663-671, 1963.
4. HERBERT, I. V. & OBERG, C. — Immunology of larval *T. solium* infections. *Parasitic Zoonoses. Clinical and Experimental Studies*. Edited by Soulsby. New York, Academic Press, 1974, 199-211.
5. HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M. & NAGASSE, T. K. — Stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 20: 208-212, 1978.
6. LOWRY, O. H.; ROSEBROUCH, N. J.; FARR, L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
7. NASCIMENTO, E. & ARAÚJO, F. G. — Estudos imunológicos em extratos aquosos de larvas e adultos de *Taenia solium*. I. Imunogenicidade e composição antigênica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 24: 353-358, 1982.
8. NASCIMENTO, E. & ARAÚJO, F. G. — Estudos imunológicos em extratos aquosos de *Taenia solium*. II. Relacionamento antigênicos, padrões cromatográficos.

- cos, atividade imunológica do escólex. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 24: 359-363, 1982.
9. NAHAJAN, R. C.; CHITKARA, N. L. & CHOPRA, J. S. — Evaluation of cysticercosis and adult worm antigen in serodiagnosis of cysticercosis. *Indian I. Med. Res.* 62: 1310, 1974.
10. POWELL, S. J.; PROCTOR, E. M.; WILMOT, A. J. & BARNETT, A. M. — Neurological complications of cysticercosis in Africans; a clinical and serological in Africa. *Ann. trop. Med. Parasitol.* 60: 146-151, 1966.
11. PROCTOR, E. M.; POWELL, S. J. & ELSDON-DEW, E. — The serological diagnosis of cysticercosis in Africa. *Ann. trop. Med. Parasitol.* 60: 146-151, 1966.
-

Recebido para publicação em 29/8/1983.