

ANDREA DOMÊNICA TEODORO DA SILVA

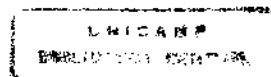
**DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA
IMUNOENZIMÁTICA QUANTITATIVA PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROCYSTICERCOSE**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas, na área de
Ciências Biomédicas*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi

Campinas

1999



11/10/2012

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	Si38d
V. Ex.	
VALOR	01,39,909
FACOD.	278,100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/01/00
N.º CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM-00134429-1

Si38d

Silva, Andrea Domênica Teodoro da
Desenvolvimento de uma técnica imunoenzimática quantitativa para
o imunodiagnóstico da neurocisticercose / Andrea Domênica Teodoro
da Silva. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Cláudio Lúcio Rossi
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Líquido cefalorraquidiano. 2. Reações antígeno-anticorpo. I.
Cláudio Lúcio Rossi. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Claudio Lúcio Rossi

Membros:

1. Prof. Dr. José Antônio Luvramento - José Antônio Luvramento
2. Prof. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta - M. H. Blotta
3. Prof. Dr. Claudio Lúcio Rossi - Rossi

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/11/99

Ao meu companheiro Márcio, pelo amor,

incentivo e compreensão

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi, pela orientação, apoio e compreensão.

À Dra. Maria Heloísa S. L. Blotta, pela amizade e estímulo.

Aos funcionários da Seção de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo apoio técnico e compreensão.

Aos amigos, Adriane Marangom, Alexandre Augusto Cherubim Camargo, Flávia Millena Biroli Tokarski, Lisandra Akemi Suzuki, Marcelo Tokarski Pereira e Ronei Luciano Mamoni que me apoiaram em momentos decisivos da minha vida.

Aos meus pais e irmãos que sempre me deram força, amizade e amor.

RESUMO	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. ARTIGO	8
Abstract.....	10
Introduction.....	11
Material and Methods.....	13
Results.....	18
Discussion.....	20
References.....	23
Table 1.....	28
Table 2.....	29
Figure 1.....	30
3. DISCUSSÃO	32
4. CONCLUSÕES	42
5. SUMMARY	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47



RESUMO

A cisticercose é considerada um importante problema de saúde pública em países da Ásia, África e América Latina. Na América Latina, frequências elevadas desta doença têm sido registradas no México, Peru, Chile e Brasil. A doença é causada pela infecção com o estágio larval (*Cysticercus cellulosae*) do parasita *Taenia solium*. Isto ocorre através da ingestão de alimentos contaminados por fezes, contendo ovos de *T. solium*, de auto-infecção fecal-oral ou de auto-infecção por peristalse reversa. A forma embrionária do parasita penetra a mucosa intestinal, cai na corrente sanguínea, migrando, principalmente, para músculo esquelético, tecido subcutâneo, olhos e sistema nervoso central (SNC).

Quando os cisticercos estão presentes no SNC (neurocisticercose), dependendo do número, localização e estágio de desenvolvimento, podem causar sintomatologia extremamente severa. As manifestações clínicas da neurocisticercose são variadas e inespecíficas. Assim, o diagnóstico definitivo deve ser sempre considerado em um contexto epidemiológico e confirmado por dados laboratoriais e de imagem. As técnicas de neuroimagem, tais como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear, além de permitirem um diagnóstico mais preciso da neurocisticercose, têm contribuído para uma melhor compreensão dos processos patofisiológicos da infecção. Entretanto, devido ao seu alto custo, as técnicas de imagem são, praticamente, inacessíveis para países em desenvolvimento, onde a incidência da doença é bastante elevada.

A pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae* em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com suspeita clínica de neurocisticercose tem sido muito utilizada para o diagnóstico da infecção. No presente estudo, é descrita uma técnica imunoenzimática (ELISA) quantitativa para o imunodiagnóstico da neurocisticercose. A técnica de ELISA foi padronizada usando uma fração purificada (FPC I) de um extrato bruto de *C. cellulosae*, obtida por meio de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel. Em um estudo comparativo, a técnica quantitativa de ELISA usando a fração FPC I (ELISA-FPC) e uma técnica de ELISA qualitativa padronizada com um extrato bruto de *C. cellulosae* (ELISA-EBCC) foram usadas para a pesquisa de anticorpos IgG anti - *C. cellulosae* em amostras de LCR de 57 pacientes com neurocisticercose e 50 pacientes com infecções heterólogas (neurosífilis, neurotoxoplasmose, neurocriptococose,

esclerose múltipla e meningites bacteriana e viral). As duas técnicas de ELISA apresentaram sensibilidade de 95% , enquanto que as especificidades obtidas com as técnicas ELISA-FPC e ELISA-EBCC foram de 100% e 92%, respectivamente. O bom desempenho, em termos de sensibilidade e especificidade, aliado ao baixo custo, indicam que a técnica ELISA-FPC pode ser de grande utilidade para o imunodiagnóstico da neurocisticercose.

1. INTRODUÇÃO

A neurocisticercose é um grave problema de saúde pública em muitos países da Ásia, África e América Latina, particularmente nos países em desenvolvimento, onde a precariedade das condições de saneamento básico e o baixo nível sócio-econômico e cultural das populações colaboram para a persistência e disseminação da infecção. Mesmo nos países desenvolvidos, a neurocisticercose tem despertado a atenção dos órgãos responsáveis pela saúde pública. Nos Estados Unidos da América, principalmente na região sul, têm sido detectados, nos últimos anos, vários casos de neurocisticercose, possivelmente acarretados pelo crescente processo de imigração (EARNEST *et al.*, 1987; SCHARF, 1988; CDC, 1992a; SCHANTZ *et al.*, 1992; SORVILLO *et al.*, 1992). A prevalência mundial de infecção teníase/cisticercose é estimada em 50 milhões de pessoas (CDC, 1992b). No Brasil, os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo e Distrito Federal são considerados áreas endêmicas (AGAPEJEV, 1996).

A cisticercose é uma das mais graves e freqüentes infecções parasitárias do sistema nervoso central (SNC). Vários estudos têm identificado a neurocisticercose como a principal causa de doenças neurológicas autolimitantes (DEL BRUTTO & SOTELO, 1988; CARPIO *et al.*, 1994). A taxa de letalidade em pacientes com neurocisticercose é muito variável. Estudos realizados em Serviços de Neurocirurgia e Neurologia no Brasil, têm mostrado uma taxa de letalidade variando de 4,8 a 30,3% (MACHADO, PIALARISSI, VAZ, 1988; AGAPEJEV, 1996).

O homem é o hospedeiro definitivo da *Taenia solium*. A infestação se dá, usualmente, pelo consumo de carne de porco mal cozida, contendo cisticercos viáveis, levando ao desenvolvimento da teníase. Cisticercose, por outro lado, é uma infecção sistêmica que ocorre quando o homem torna-se o hospedeiro intermediário. Isto resulta da ingestão de alimentos contaminados por fezes, contendo ovos de *T. solium*, de auto-infecção fecal-oral ou de auto-infecção causada por peristalse reversa. Um dos aspectos mais importantes da cisticercose é a localização freqüente dos cisticercos no SNC (neurocisticercose). A incidência de comprometimento cerebral é da ordem de 60% (ACHA & AGUILAR, 1964). No intestino do homem com teníase, o protoescólex evagina do cisticerco e fixa-se à parede intestinal por meio de ventosas e acúleos. O parasita desenvolve-se pela formação de segmentos chamados proglotes. Estes, quando amadurecem, formam testículos e ovários. Os ovos são fertilizados dentro dos proglotes.

Assim, os proglotes terminais, contendo, aproximadamente, 50.000 ovos cada, são liberados nas fezes. O hospedeiro intermediário, normalmente o porco, é infectado pela ingestão dos ovos. Estes, estimulados pela ação do ácido gástrico e fluidos intestinais, liberam o embrião hexacanto, chamado *Cysticercus cellulosae*, quando no estágio de larva madura. O embrião penetra a mucosa intestinal, cai na corrente sanguínea, migrando, principalmente, para músculos e cérebro, originando, desta forma, a cisticercose. O homem, através da ingestão dos ovos, pode, também, tornar-se o hospedeiro intermediário da *T. solium*. Os embriões penetram a mucosa intestinal, caem na corrente sanguínea, migrando, principalmente, para o SNC, músculo esquelético, tecido subcutâneo e olhos. O embrião hexacanto leva, aproximadamente, 2 meses para transformar-se em cisticerco (ESCOBAR & NIETO, 1972). A forma larvária pode sobreviver sem alterações significativas por meses ou anos, antes de entrar em processo de degeneração com conseqüente fibrose e calcificação, comuns em infecções de longa duração (VAZ, 1996).

As manifestações clínicas da neurocisticercose são variadas e inespecíficas. A sintomatologia da infecção depende da localização, do número e do estágio de desenvolvimento dos cisticercos, além da resposta imune do hospedeiro (SOTELO, GUERRERO, RUBIO, 1985; CHANDY *et al.*, 1989; RAJSHEKHAR, 1991; DEL BRUTTO, 1997; WHITE, ROBINSON, KUHN, 1997). As manifestações clínicas podem ser numerosas e extremamente sérias, como epilepsia, hipertensão intracraniana, hidrocefalia, demência, meningite e paraparesia, entre outras (AGAPEJEV, 1996). A manifestação clínica mais comum é a epilepsia (SHANLEY & JORDAN, 1980; RANGEL *et al.*, 1987).

O diagnóstico clínico da neurocisticercose é problemático, em razão da variedade e da inespecificidade das manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes, além do fato de muitos permanecerem assintomáticas por longo tempo. Dada a dificuldade do diagnóstico clínico, os recursos laboratoriais e de imagem são essenciais para a confirmação da suspeita clínica. Os principais métodos utilizados para o diagnóstico da neurocisticercose dividem-se em dois grupos: exames de imagem (tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear) e técnicas de análise laboratorial do líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro. A demonstração histológica dos cistos, através de biopsia, pode, também, ser utilizada para a confirmação do diagnóstico da

neurocisticercose. Entretanto, nos últimos anos, esta técnica tem sido substituída por metodologias não invasivas. O avanço da tecnologia laboratorial vem melhorando a precisão do diagnóstico, fornecendo informações sobre a localização dos cisticercos, o grau de reação inflamatória e da resposta imune do hospedeiro. A tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética nuclear (RMN) permitem a visualização de estruturas comparáveis em tamanho ao parasita, auxiliando no diagnóstico, no prognóstico e no acompanhamento da evolução da infecção. A TC apresenta alta sensibilidade para identificar mínimas calcificações e formas não granulomatosas da neurocisticercose. No entanto, o diagnóstico diferencial é importante em casos de lesões únicas, que podem ser confundidas com toxoplasmose, tuberculose, hidatidose, abscesso, granuloma micótico, tumores que calcificam, metástase, entre outras afecções do SNC (ALMEIDA-PINTO *et al.*, 1988). A RMN é de grande valia para detecção de lesões na base do cérebro e de cistos localizados na medula ou nas leptomeninges, onde a TC, normalmente, é inconclusiva (DEL BRUTTO & SOTELO, 1988; KRAMER *et al.*, 1989). Entretanto, alguns estudos mostram que a RMN pode apresentar baixa sensibilidade para a detecção de pequenas lesões calcificadas (PALACIOS, LUJAMBIO, JASSO, 1997; GARG, 1998). Assim, a confirmação imunológica é, freqüentemente, necessária para exclusão de outras lesões do SNC, de origem infecciosa, vascular ou neoplásica (BONAMETTI *et al.*, 1992; COULDWELL *et al.*, 1995; CASTILLO *et al.*, 1996). O número de casos diagnosticados de neurocisticercose tem aumentado significativamente nos últimos anos devido à utilização das técnicas de imagem. Todavia, estas técnicas são muito sofisticadas e inacessíveis à maioria dos centros de saúde de países em desenvolvimento que, no caso, são os mais afetados pelo complexo teníase/cisticercose/neurocisticercose. Nestas condições, as técnicas de análise do LCR e soro são de grande utilidade para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da neurocisticercose. A análise da citologia e bioquímica do LCR fornece informações sobre o grau de inflamação local, definindo características do processo inflamatório presente. Vários estudos contribuíram para a definição da síndrome do LCR na neurocisticercose (LANGE, 1940; SPINA-FRANÇA, 1960; LIVRAMENTO, 1986; LIVRAMENTO, 1987; SPINA-FRANÇA, LIVRAMENTO, MACHADO, 1993; MACHADO, 1996). A presença de eosinófilos e hipercitose, aumento de gamaglobulinas e

reações imunológicas positivas para pesquisa de anticorpos específicos contra *C. cellulosae* são características marcantes da síndrome do LCR, na neurocisticercose.

A pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae* tem sido realizada em amostras de soro, LCR e saliva. Em circunstâncias normais, o LCR encontra-se quase livre de imunoglobulinas. No entanto, em infecções do SNC, normalmente, há concentração elevada de anticorpos específicos contra o agente infeccioso (MILLER *et al.*, 1985; RESNICK *et al.*, 1985; SCOTT *et al.*, 1987). Desse modo, o LCR tem sido, freqüentemente, utilizado na pesquisa de anticorpos específicos contra vários agentes etiológicos que causam infecção no SNC, incluindo o *C. cellulosae*. Entre as técnicas imunológicas utilizadas para a pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae* destacam-se as reações de fixação de complemento (RFC), hemaglutinação passiva (HP), imunofluorescência indireta (IFI) e as técnicas imunoenzimáticas (ELISA, Imunoblot).

Em 1909, Weinberg, na França, padronizou a RFC para a pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae*, em amostras de soro. Em 1911, Moses, utilizando a RFC, demonstrou a presença de anticorpos anti - *C. cellulosae* no LCR. Até 1940, a RFC e a reação de precipitação em tubos, introduzida em 1935 por Rothfeld (citado por BIAGI & TAY, 1958), eram os únicos testes sorológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. Em 1964, Biagi & Pinhã introduziram a reação de IFI. Proctor, Powell e Elsdon-Dew, em 1966, padronizaram a reação de HP, utilizando um extrato bruto de cisticercos para sensibilização das hemácias. Em 1971, Petithory, Jay e Feillet introduziram a técnica de imunoeletroforese (IEF) e, em 1978, Arambulo *et al.*, desenvolveram a técnica de ELISA para o diagnóstico da cisticercose. Tsang, Brand e Boyer, em 1989, padronizaram uma técnica de Imunoblot, utilizando uma fração glicoprotéica de cisticercos com afinidade por lentil-lectina.

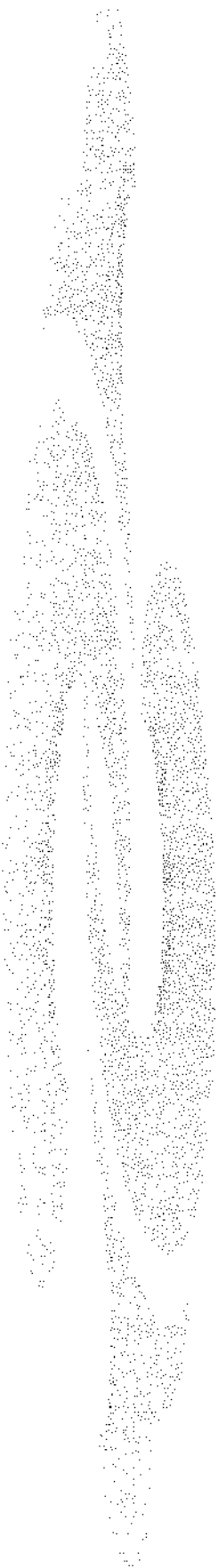
A RFC foi a primeira técnica usada para o imunodiagnóstico da neurocisticercose. A RFC, em amostras de soros, além de baixa sensibilidade, apresenta um número significativo de reações cruzadas com outras infecções parasitárias. No LCR, a RFC mostra sensibilidade em torno de 70%, variando conforme o estágio evolutivo da doença, a técnica e o antígeno utilizado (ROSAS, SOTELO, NIETO, 1986; GARCIA & SOTELO, 1991). A HP, embora com maior sensibilidade que a RFC, apresenta reduzida

especificidade. Em amostras de soros, têm-se obtido índices de sensibilidade e especificidade em torno de 80% (NASCIMENTO, NOGUEIRA, TAVARES, 1987; LARRALDE *et al.*, 1990). Em amostras de LCR, estes índices são maiores, quando comparados aos resultados obtidos com soro (PIALARISSI *et al.*, 1987). A IFI, utilizando amostras de LCR, apresenta sensibilidade superior à RFC, mas com porcentagem significativa de reações cruzadas (BASSI *et al.*, 1979a; BASSI *et al.* 1979b). A técnica de ELISA para cisticercose, descrita, originalmente, em 1978 por Arambulo *et al.*, tem sido a reação mais empregada no imunodiagnóstico da neurocisticercose. Índices de sensibilidade superiores a 90% têm sido observados em ensaios com amostras de LCR. (ESPINOZA *et al.*, 1986; ROSAS *et al.*, 1986; VAZ *et al.*, 1996). Tsang *et al.*, em 1989, padronizaram um teste de Imunoblot para a pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae*, que tem sido apontado como um dos testes imunológicos mais efetivos para o imunodiagnóstico da cisticercose. No trabalho original, a análise de uma bateria de 532 amostras de soros e 46 amostras de LCR mostrou que o teste de Imunoblot apresentava 98% de sensibilidade e 100% de especificidade. A eficácia deste teste está diretamente relacionada ao uso de uma fração antigênica purificada, composta de glicoproteínas com peso molecular variando de 13 a 50 kD, obtida pelo fracionamento do extrato bruto de *C. cellulosae*, por meio de cromatografia de afinidade, utilizando Sepharose-lentil-lectina.

É importante ressaltar que dificuldades na aplicação dos métodos imunológicos estão, muitas vezes, relacionadas ao preparo e à padronização dos antígenos. Reações imunoenzimáticas utilizando extratos brutos de *C. cellulosae*, embora com alta sensibilidade, podem apresentar porcentagem significativa de reações cruzadas (ESPINOZA *et al.*, 1986; ROSAS *et al.*, 1986; CORREA *et al.*, 1989; RAMOS-KURI *et al.*, 1992; NG & KO, 1994). Estudos de Ito *et al.*, em 1998, evidenciaram que o uso de frações antigênicas purificadas por focalização isoeétrica em reações imunológicas de alta sensibilidade, como as técnicas de ELISA e Imunoblot, podem gerar excelentes resultados em termos de sensibilidade e especificidade. No entanto, dependendo dos processos utilizados na purificação dos antígenos, componentes antigênicos importantes podem ser removidos, originando resultados falso negativos.

A maioria dos testes imunoenzimáticos utilizados para o imunodiagnóstico da neurocisticercose são qualitativos ou, no máximo, semi-quantitativos. Uma reação imunoenzimática quantitativa para a pesquisa de anticorpos específicos requer que todos os reagentes utilizados, exceto aquele sendo testado, estejam presentes em excesso. Na padronização da reação, é essencial que a atividade enzimática seja medida durante a porção linear da reação, quando a concentração do substrato é muito maior do que a concentração da enzima. A padronização da técnica envolve, também, a utilização de padrões com concentrações conhecidas de anticorpos, que devem ser utilizados em todos os ensaios (HANCOCK & TSANG, 1986). A reatividade da amostra testada é determinada utilizando a curva gerada pelo ensaio dos padrões. A utilização de uma curva padrão permite a diminuição da variação interensaio bem como a comparação dos resultados obtidos por diferentes laboratórios (HANCOCK & TSANG, 1986; MADDISON, 1987).

Diante do aumento do número de casos de neurocisticercose registrado nos últimos anos e da complexidade do diagnóstico clínico, este estudo foi motivado pela necessidade de aumentar a eficiência do imunodiagnóstico da neurocisticercose. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um técnica imunoenzimática quantitativa para o imunodiagnóstico da neurocisticercose, utilizando uma fração antigênica purificada do extrato bruto de *C. cellulosae* apresentando alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada.



2. ARTIGO

A Quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Immunodiagnosis of Neurocysticercosis Using a Purified Fraction from *Cysticercus cellulosae*

Andrea D T da Silva*, Elizabeth M A Quagliato** and Cláudio L Rossi*

* Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

**Department of Neurology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence to Cláudio Lúcio Rossi, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), P.O. Box 6111, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis is described. The ELISA was standardized using a purified *Cysticercus cellulosae* fraction (PCF I) obtained by ion exchange chromatography. The ELISA using PCF I (PCF-ELISA) and a qualitative ELISA using a whole extract from *C. cellulosae* (WECC-ELISA) were used to screen for *Cysticercus*-specific IgG antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) samples from 57 patients with neurocysticercosis and 50 patients with heterologous infections. The sensitivity of both assays was 95%, whereas the specificities of PCF-ELISA and WECC-ELISA were 100% and 92%, respectively. The excellent sensitivity and specificity of the PCF-ELISA make this assay a potentially useful tool in screening for antibodies against *C. cellulosae*.

INTRODUCTION

Cysticercosis is an important health problem in many Asia, Africa and Latin America countries which have inadequate sanitary conditions, as well as in some industrialized nations with a high immigrant population from disease-endemic areas (CDC, 1992; Earnest et al. 1987; Schantz et al. 1992; Scharf 1988; Sorvillo et al. 1992). In South America, high frequencies of this disease have been reported in Peru, Chile and Brazil (Agapejev 1996).

Cysticercosis is caused by infection with the larval form (cysticercus) of the tapeworm *Taenia solium*. Human infection occurs following the accidental ingestion of *T. solium* eggs passed in the feces of persons harboring the adult tapeworm. The larvae released from the eggs in the small intestine of infected persons penetrate the intestinal mucosa and are carried to different tissues where they develop into cysticerci. The cysticerci may be located in areas where they produce no symptoms, such as muscle or cutaneous tissues. On the other hand, the presence of cysticerci in the central nervous system (CNS), a condition known as neurocysticercosis, can cause seizures and other neurological problems (Almeida-Pinto et al. 1988; Del Brutto and Sotelo 1988; Del Brutto 1997; Palacios et al. 1997; White 1997). The clinical signs and symptoms of neurocysticercosis are variable and non-specific, leading to different neurological and psychiatric diagnoses (Del Brutto 1997; Del Brutto and Sotelo 1988; White 1997). Thus, a definitive diagnosis of neurocysticercosis should always be considered in an epidemiological context and confirmed by laboratory and/or image data (Del Brutto 1997).

The methods used for diagnosing neurocysticercosis include neuroimaging techniques (computed tomography and nuclear magnetic resonance), histological demonstration of the parasite in biopsies and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. The detection of specific antibodies against *Cysticercus cellulosae* antigens in CSF samples from patients suspected of having neurocysticercosis is a useful tool for diagnosing the disease, especially when neuroimaging techniques are not available or inconclusive (Bonametti et al. 1992; Castillo et al. 1996; Couldwell et al. 1995; Wilson et al. 1991; Zini et al. 1990).

Several techniques have been used for the immunological diagnosis of neurocysticercosis, including complement fixation (Weinberg 1909), indirect immunofluorescence (Biagi and Pinhã 1964), indirect hemagglutination (Proctor et al. 1966), immunoelectrophoresis (Petithory et al. 1971), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Arambulo et al. 1978) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay (Tsang et al. 1989). The performance of immunoenzymatic techniques is superior to other techniques for the immunodiagnosis of neurocysticercosis (Espinoza et al. 1986; Feldman et al. 1990; Garcia et al. 1998; Pialarissi et al. 1987; Rosas et al. 1986). However, a significant number of cross reactions may occur when whole extracts of *C. cellulosae* are used in the assays (Correa et al. 1989; Espinoza et al. 1986; Garcia et al. 1998; Rosas et al. 1986; Ng and Ko 1994). In this article, we report the results obtained with a quantitative ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis using as the antigen a fraction purified from a whole extract of *C. cellulosae*.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals were reagent grade or better and, unless otherwise stated, were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

C. celulosae antigens

Cysticerci obtained from a heavily infected freshly slaughtered pig were washed extensively with sterile 0.15 M phosphate buffered saline (0.15 M), pH 7.2 (PBS) and were stored in aliquots at -80°C . For antigen preparation, frozen cysts were quickly thawed and resuspended in approximately three volumes of PBS containing protease inhibitors (5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.0025 mM leupeptin) and the material then homogenized in an ice-water bath using a Polytron[®] homogenizer (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, New York, USA) equipped with a PT-20 ST probe. (three 30-s. pulses at speed 3 with 30-s. intervals between pulses). The homogenate was then sonicated for 3 min. (1-min. sonication / 1-min. pauses) in an ice-water bath using a Branson Sonicator (model SX-30, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) at a power setting of three with a 20% pulse duty cycle. Protease inhibitors (PMFS and leupeptin) were subsequently added to the sonicated material at concentrations described above and the suspension was gently stirred for 2 h at 4°C . Centrifugation of this material at 20,000 g for 60 min. at 4°C resulted in a white floating layer followed by a clear supernatant and finally a pink pellet. After removing the floating layer with a Pasteur pipette, the supernatant was collected and filtered through 0.45 and 0.22 μm filters (Millex filters, Millipore Corporation, Bedford, USA). Whole extracts of *C. celulosae* (WECC) were aliquotted and stored at -80°C until used. For fractionation, the WECC was equilibrated with 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 (Tris buffer) by passage through a pre-packed PD-10 column (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ). The collected material was subsequently loaded onto a DEAE-Sephacel column equilibrated with Tris buffer, the column size being dependent on the amount of protein to be fractionated (1 ml of resin was used for every 3 mg of protein). The column was washed with the equilibrating buffer and 1.5 ml fractions were collected until the absorbance at 280 nm (A_{280}) returned to baseline values. The fractions with an

A₂₈₀ above baseline levels were pooled and the material was concentrated using a YM-10 membrane (Amicon Corporation, Danvers, USA) and stored in aliquots at - 80 °C until used. The fraction eluted with the starting Tris buffer was named purified *Cysticercus* fraction I (PCF I). Two other antigen fractions were obtained by eluting the column with Tris buffer containing 0.25 M NaCl (PCF II) and 1 M NaCl (PCF III).

Human serum pools

Two pools of sera, *C. cellulosae* (CCP) and heterologous infections (HIP), were used to test the WECC and the fractions from DEAE-Sephacel. The CCP pool was prepared by mixing equal parts of sera from seven patients with parasitologically confirmed cysticercosis who had positive ELISA tests for *C. cellulosae*. The HIP pool was prepared by mixing equal parts of sera from 12 patients with heterologous infections as follows: four patients with toxoplasmosis, three patients with syphilis, two patients with leishmaniasis; two patients with schistosomiasis and one patient with echinococcosis. All of these patients were resident in areas non-endemic for cysticercosis.

Serum standards

The CCP pool was arbitrarily designed as having 1,280 antibody activity units per ml (AU/ml). Serum standards, with values ranging from 1 to 1,280 AU/ml, were prepared by diluting the CCP pool with PBS containing 0.1% Tween 20 and 0.1% bovine serum albumin (PBS-Tween-BSA).

Determination of optimal reagent concentrations

The ELISA procedure was standardized using excess amounts of all reagents except the one being tested. The optimal concentration of the conjugate (affinity purified goat anti-human IgG labelled with peroxidase) was based on conjugate titration experiments using IgG coated polystyrene plates. For antigen titration, increasing amounts of antigens (0.1 to 8.0 µg/ml) were used.

Linearity of substrate conversion

The linearity of substrate conversion was determined using a serum standard containing 20 AU/ml. The rate of substrate conversion was assessed after 1, 2.5, 5, 9, 12, 18, 23 and 30 min of incubation at room temperature.

ELISA procedure using a whole extract from *C. cellulosa*

The WECC, diluted to 4 µg/ml in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.5, was used to sensitize wells of U-bottomed ELISA plates (Corning, New York, USA). After sensitization for 1 h at room temperature and 14 h at 4 °C, the wells were washed twice with PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-Tween), after which 100 µl of 0.1% BSA in PBS were added to the wells. Following incubation for 30 min at room temperature, the wells were washed once with PBS-Tween and 100 µl of each CSF sample were added to the wells. After a further 1 h incubation at room temperature and washing four times with PBS-Tween, 100 µl of the optimal dilution of the conjugate in PBS-Tween were added to the wells and the plate incubated for 1 h at room temperature followed by washing with PBS-Tween, as described previously. Immediately after washing 100 µl of the substrate system, containing 1.42 mM H₂O₂ and 3.7 mM orthophenylenediamine (OPD), were added to the wells. Five minutes after the addition of substrate, 50 µl of 2N H₂SO₄ were added to each well to stop the colour reaction and the resulting absorbances then measured at 492 nm using an ELISA reader (Spectra SLT, SLT Instruments, Austria). Three positive controls and a negative control were included in each plate. The final optical density for each well was determined by subtracting the mean optical density of three antigen controls in the corresponding plate. All CSF samples were tested in duplicate and the mean absorbance determined. For determination of the cut-off value, 50 CSF samples from patients with no clinical and laboratorial evidence of infection by *C. cellulosa* were assayed. The cut-off value was defined as the mean absorbance obtained with these 50 CSF samples plus two standard deviations. CSF samples with absorbance values higher than the cut-off value were considered positive.

ELISA procedure using the *Cysticercus cellulosae* fractions

The *Cysticercus* fractions, diluted to 4 µg/ml in 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.3 M KCl and 2 mM EDTA, were used to sensitize the wells of U-bottomed ELISA plates (Corning, New York, USA). After sensitization for 1 h at room temperature and 14 h at 4 °C, the wells were washed twice with PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-Tween), after which 100 µl of 0.1% BSA in PBS were added to the wells. Following incubation for 30 min. at room temperature, the wells were washed once with PBS-Tween and 100 µl of each CSF sample were added to the wells. After a further 1 h incubation at room temperature and washing four times with PBS-Tween, 100 µl of the optimal dilution of the conjugate in PBS-Tween were added to the wells and the plate incubated for 1 h at room temperature followed by washing with PBS-Tween, as described previously. Immediately after washing 100 µl of the substrate system, containing 1.42 mM H₂O₂ and 3.7 mM orthophenylenediamine (OPD), were added to the wells. Five minutes after the addition of substrate, 50 µl of 2N H₂SO₄ were added to each well to stop the colour reaction and the resulting absorbances then measured at 492 nm using an ELISA reader (Spectra SLT, SLT Instruments, Austria). Three positive controls and a negative control were included in each plate. The final optical density for each well was determined by subtracting the mean optical density of three antigen controls in the corresponding plate. A standard curve serum standards ranging from 1 to 1,280 AU/ml was included in each plate, with each serum standard being tested in triplicate. All CSF samples were tested in duplicate and the mean activity determined. This mean activity was used in conjunction with the appropriate standard curve to translate the optical density readings into AU/ml. The cut-off value for the assay was determined by the J index (Youden 1950).

Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay

The EITB assay used lentil-lectin, affinity-purified glycoprotein antigens blotted onto nitrocellulose strips (8.5 cm x 16.5 cm) after SDS-PAGE. After blotting, an Accutran[®]-cutter (Schleicher and Schuell, Keene, USA) was used to produce identical 3 mm wide strips. Using this assay, seven glycoprotein bands are commonly recognized by antibodies from sera or CSF samples from patients with cysticercosis. For this study, the

strips containing glycoproteins from *C. cellulosa* were kindly supplied by Dr. Victor Tsang (Centers for Disease Control, Atlanta, USA). The EITB procedure was performed as described by Tsang et al. 1989. Briefly, an Accutran system (Schleicher and Schuell) consisting of incubation trays and a strip washer was used for the assays. All incubations were performed at room temperature in the troughs of Accutran incubation trays containing 0.5 ml of the reagents. The trays were gently rocked back and forth during the incubation and washing steps to ensure total submersion of the strips. Sensitized strips were incubated with CSF samples diluted 1:10 with PBS containing 0.3% (v/v) Tween 20 and 5% nonfat dried milk for 1 h. Unbound CSF components were removed by four 5-min. washes with PBS-Tween. The strips were then incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat antibody to human IgG diluted 1:750 with PBS-Tween. After five 5-min. washes, four with PBS-Tween and one with PBS, bound antibodies were visualized by incubating the strips with the substrate system (3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂) for 5 min. After ten 2-min. washes with deionized water to stop the reactions, the strips were removed from the trays, placed on a plastic sheet and air dried. Two positive controls and a negative control were included in each assay. The reactions were read visually; strips showing at least one well-defined diagnostic band were considered positive.

Cerebrospinal fluid (CSF) samples

A total of 107 CSF samples were obtained from the following groups; 57 patients with neurocysticercosis, 11 patients with neurosyphilis, 9 patients with neurotoxoplasmosis, 11 patients with neurocryptococcosis, 6 patients with multiple sclerosis, 6 patients with bacterial meningitis and 7 patients with viral meningitis. All 57 patients with neurocysticercosis had computed tomography compatible with neurocysticercosis. All 50 patients with heterologous infections had no significant clinical or radiological data for neurocysticercosis. Ten CSF samples from patients with neurosyphilis were kindly supplied by Dr. José A. Livramento (Centro de Investigações em Neurologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). All other CSF samples were obtained from patients attended at the university hospital of the State University of Campinas (Campinas).

RESULTS

The WECC was fractionated on DEAE-Sephacel and the resulting fractions were assayed in parallel by ELISA against pooled sera from patients with cysticercosis (CCP) and heterologous infections (HIP). One parasite fraction (PCF I) was selected for further study based on its reactivity with CCP and HIP. Results from two chromatographic runs revealed that PCF I produced a CCP/HIP absorbance ratio at least three times higher than WECC (Table 1).

On the basis of antigen titration, an excess antigen concentration was achieved at concentrations greater than 2 µg/ml. All assays requiring antigen excess were performed with 4 µg *Cysticercus* antigen/ml. Conjugate excess occurred at a dilution lower than 1:1,000. All assays requiring conjugate excess were performed using a 1:800 conjugate dilution. Linearity studies showed that the substrate conversion rates were linear for at least 9 min. for serum standard containing 20 AU/ml. Additional experiments were performed with a normal human serum pool to select the best substrate time. A 5 min. incubation was chosen because this time provided the best colour contrast between positive and negative reactions. Each PCF-ELISA included a standard curve covering a wide range of reactivities (expressed as AU/ml). Each CSF sample was tested in duplicate and the mean activity was converted into AU/ml using the standard curve.

Fifty-seven CSF samples from patients with neurocysticercosis and 50 CSF samples from patients with heterologous infections were tested by ELISA using a whole extract of *C. cellulosae* (WECC-ELISA) and the purified fraction PCF I (PCF-ELISA). The results of all CSF samples tested by PCF-ELISA are shown in Figure 1. The CSF samples from patients with neurocysticercosis ranged in activity from 1.0 to 1,280 AU/ml. All CSF samples from patients with heterologous infections had activities ≤ 8.0 AU/ml. The cut-off value for the assay was determined by the J index (Youden 1950). The formula for this index is: $J = (a+b) + (c+d) - 1$, where a is the number of subjects infected with a positive CSF sample, b is the total number in the infected group, c is the number uninfected with a negative CSF sample, and d is the total number in the uninfected group. The highest J index was obtained when 10 AU/ml was used as the cut-off value. At this cut-off level, 3

out of 57 patients with neurocysticercosis and all 50 patients with heterologous infections were negative by PCF-ELISA. In the 57 CSF samples from patients with neurocysticercosis, 54 were positive by WECC-ELISA and PCF-ELISA and three were negative by both assays. All 50 CSF samples from patients with heterologous infections were negative by PCF-ELISA whereas four CSF samples were positive by WECC-ELISA (two from patients with neurotoxoplasmosis and two from patients with bacterial meningitis). The latter four patients had no significant clinical, epidemiological and radiological data for neurocysticercosis. The two patients with neurotoxoplasmosis had a significant IgG antibody titer to *T. gondii* in CSF detected by an indirect immunofluorescence (IIF) test; one of the patients also had a significant IgM antibody titer to *T. gondii* by an IIF test. One of the patients with bacterial meningitis had a positive CSF culture for *Mycobacterium tuberculosis* while the other had a positive CSF culture for *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pneumoniae*. The three CSF samples from patients with neurocysticercosis who were negative by WECC-ELISA and PCF-ELISA and the four CSF samples from patients with heterologous infections who were positive by WECC-ELISA and negative by PCF-ELISA all had negative results by the EITB assay.

Based on the above results, the PCF-ELISA and WECC-ELISA exhibited 95% sensitivity, whereas the specificities of the PCF-ELISA and WECC-ELISA were 100% and 92%, respectively (Table 2).

Within-run and run-to-run variations of the PCF-ELISA were determined using a serum standard (20 AU/ml). The mean coefficient of variation for 72 repeats of the assay to determine within-run variation was 5.6%. The mean interassay coefficient of variation determined by assaying serum standards in triplicate on 11 alternate days was 11.9%.

DISCUSSION

The clinical manifestations of neurocysticercosis are nonspecific and vary, depending on the number, localization and developmental stage of the cysticerci in the SNC (Livramento 1987; White et al. 1997). The usual symptoms and signs are manifestations of three major pathophysiological process as namely, the mass effect, the inflammatory response evoked by the parasite and the obstruction of the foramina and ventricular system of the brain. The diagnosis of neurocysticercosis is based on clinical, epidemiological, laboratory and neuroimaging data (Del Brutto, 1997). Neuroimaging techniques such as computed tomography and nuclear magnetic resonance have contributed to a more accurate diagnosis and a better understanding of the pathophysiology of neurocysticercosis (Del Brutto 1997; Palacios et al. 1997; White 1997). However, because of their high cost and restricted availability, these procedures may be of limited use in developing countries with high rates of infection.

The detection of specific antibodies against *C. cellulosae* antigens in CSF samples from patients suspected of having neurocysticercosis is a useful tool for diagnosing the disease (Machado et al. 1988, Spina-França et al. 1993). A variety of methods has been used to detect *Cysticercus*-specific antibodies in CSF from patients suspected of having neurocysticercosis (Corona et al. 1986, Garcia et al. 1998, Garcia and Sotelo 1991, Larralde et al. 1990, Pialarissi et al. 1987, Simac et al. 1995, Tsang *et al.* 1989). The performance of immunoenzymatic techniques is superior to other standardized techniques for the immunodiagnosis of neurocysticercosis (Espinoza et al. 1986; Garcia et al. 1995; Rosas et al. 1986). However, significant variations are often observed in the ELISA results for neurocysticercosis. These variations are probably related to several factors, including the heterogeneity of the patients studied, the immune status of the patients at the time of CSF collection, the intrinsic properties of the techniques, the mode of antigen preparation, the quality of the conjugate and substrate used in the assays and the method of calculating the cut-off value. When the assay is performed with a whole *Cysticercus* extract, there is a significant number of false-positive results because of cross-reactivity with other parasite antigens (Correa et al. 1989; Espinoza et al. 1986; Rosas et al. 1986; Ng and Ko 1994).

In the present report, we have described a quantitative ELISA for neurocysticercosis using a purified fraction (PCF) from a whole antigenic extract of *C. cellulosae*. The results obtained indicate that the PCF-ELISA is as sensitive as and more specific than an ELISA using a whole extract of the parasite. No cross-reactivity was observed with PCF-ELISA using CSF from patients with heterologous infections and only 3 out of 57 CSF samples from patients with neurocysticercosis had antibody levels below the PCF-ELISA cut-off value. Of the three CSF samples non-reactive by PCF-ELISA and WECC-ELISA, two were from patients with calcified cysts and one was from a patient with a single viable cyst in the brain cortex. Some studies have shown that immunoenzymatic assays are less likely to react in patients with calcified cysts than in those with noncalcified parasites (Chang et al. 1988; Wilson et al. 1991). This phenomenon presumably reflects the lack of antigenic stimulation by dead, calcified cysticerci (Wilson et al. 1991). Zini et al. (1990) reported that the antibody response detected by ELISA was dependent on the anatomical position of the cyst. These authors found that the ELISA results of CSF samples from patients with cysts located at the base of the brain or in the major cisterns or within the ventricles were much more likely to be positive than those of patients with cysts in the brain cortex. Although the reason for the high antibody response in patients with cysts in certain anatomical regions is unclear, it is possible that these sites may represent areas where the blood-brain barrier is not intact and lymphocytes may have access to the brain (Link 1979; Zini et al. 1990). One of the most reliable immunological tests currently available for the immunodiagnosis of cysticercosis and neurocysticercosis is an immunoblot (EITB) assay using glycoprotein (GP) antigens prepared by lectin-affinity purification from an extract of intact cysts. The GPs contain seven major bands (13 - 50 kD) which are specific for *C. cellulosae* (Tsang et al. 1989). The three CSF samples from patients with neurocysticercosis who were negative by WECC-ELISA and PCF-ELISA and the four CSF samples from patients with heterologous infections who were positive by WECC-ELISA and negative by PCF-ELISA all had negative results by the EITB assay. Initial evaluation of the EITB assay indicated 98% sensitivity and 100% specificity (Tsang et al. 1989). However, Wilson et al. (1991) showed that the sensitivity of the assay was markedly lower in patients with single enhancing or calcified intracranial lesions.

Traditionally, *T. solium* cysticerci antigens for immunodiagnostic assays are derived from parasites extracted from infected pig meat. However, in recent years *T. solium* cysticerci have become more difficult to obtain. For this reason, studies of fractionation of *C. cellulosae* must take into account the antigen yield of the fractions, since the parasites are normally difficult to obtain. Based on two chromatographic runs, the recovery of PCF in terms of total protein content was 57%.

In conclusion PCF-ELISA is as sensitive as and more specific than the WECC-ELISA. The excellent sensitivity and specificity make the PCF-ELISA a potentially useful tool in screening for antibodies against *C. cellulosae*.

REFERENCES

- Agapejev S (1996) Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 38:207-216.
- Almeida-Pinto J, Veiga-Pires JA, Stocker A, Coelho T, Monteiro L (1988) Cysticercosis of the brain: the value of computed tomography. *Acta Radiol* 29:625-628.
- Arambulo III PV, Walls KW, Bullock S, Kagan IG (1978) Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). *Acta Trop* 35:63-67.
- Biagi FF, Pinhã AP (1964) Presence of antigens in calcareous corpuscles of cysticercus. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 6:114-116.
- Bonametti AM, Basile MA, Vaz AJ, Baldy JLS, Takiguti CK (1992) Índice de positividade da reação imunoenzimática (ELISA) para cisticercose no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro de pacientes com epilepsia. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 34:451-458.
- Castillo M, Salgado P, Rojas R, Sotelo J, Sanchez J, Mukherji SK (1996) Unusual imaging manifestations of neurocysticercosis. *Int J Neuroradiol* 2:168-175.
- Centers for Disease Control (1992) Locally-acquired neurocysticercosis - North Carolina, Massachusetts and South Carolina, 1989-1991. *MMWR* 41:1-4.
- Chang KH, Kim WS, Cho SY, Han MC, Kim CW (1988) Comparative evaluation of brain CT and ELISA in the diagnosis of human neurocysticercosis. *Am J Neuroradiol* 9:125-30.
- Corona T, Pascoe D, Gonzalés-Barranco D, Abad P, Landa L, Estañol B (1986) Anticysticercus antibodies in serum and CSF in patients with neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psiq* 49:1044-1049.

- Correa D, Sandoval MA, Harrison LJS, Parkhouse ME, Plancarte A, Meza-Lucas A, Flisser A (1989) Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83:814-816.
- Couldwell WT, Chandrasoma P, Apuzzo MLJ, Zee C-S (1995) Third ventricular cysticercal cyst mimicking a colloid cyst: case report. *Neurosurgery* 37:1200-1203.
- Del Brutto OH (1997) Neurocysticercosis. *Curr Opin Neurol* 10:268-272.
- Del Brutto OH, Sotelo J (1988) Neurocysticercosis: an update. *Rev Infect Dis* 10:1075-1087.
- Earnest MP, Reller LB, Filley CM, Grek AJ (1987) Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review. *Rev Infect Dis* 9:961-979.
- Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A (1986) Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 24:536-541.
- Feldman M, Plancarte A, Sandoval M, Wilson M, Flisser A (1990) Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84:559-562.
- Garcia E, Ordoñez G, Sotelo J (1995) Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western-blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. *J Clin Microbiol* 33:3324-3325.
- Garcia E, Sotelo J (1991) A new complement fixation test for the diagnosis of neurocysticercosis in cerebrospinal fluid. *J Neurol* 238:379-382.

- Garcia HH, Harrison LJS, Parkhouse RME, Montenegro T, Martinez SM, Tsang VCW, Gilman RH and the Cysticercosis Working Group in Peru (1998) A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92:411-414.
- Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E (1990) Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med* 114:926-928.
- Link H (1979) Some aspects of immune reactions of the brain. In: *Clinical neuroimmunology*. Ed, Rose FC. Oxford: Blackwell Scientific Publication, pp.12-28.
- Livramento JA (1987) Síndrome do líquido cefalorraquidiano na neurocisticercose. *Arq Neuropsiquiatr* 45:261-275.
- Machado ABB, Pialarissi CSM, Vaz AJ (1988) Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral, São Paulo, S. P. (Brasil). *Rev Saúde Pública* 22:240-244.
- Ng TF, Ko RC (1994) Serodiagnosis of cysticercosis: specificity of different antigens and enzyme-linked immunosorbent assays. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:421-422.
- Palacios E, Lujambio PS, Jasso RR (1997) Computed tomography and magnetic resonance imaging of neurocysticercosis. *Semin Roentgenol* 32:325-334.
- Petithory J, Jay M, Feillet M (1971) Le diagnostic par immunoelectrophorese et Ouchterlony de la cysticercose. *Encéphale* 60:24-35.
- Pialarissi CSM, Vaz AJ, Souza AMC, Nakamura PM, Camargo ED, Silva MV, Ueda M (1987) Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 29:367-373.
- Proctor EM, Powell SJ, Elsdon-Dew R (1966) The serological diagnosis of cysticercosis. *Ann Trop Med Parasit* 60:146-151.

- Rosas N, Sotelo J, Nieto D (1986) ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch Neurol* 43:353-356.
- Schantz PM, Moore AC, Muñoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aron AM, Persaud D, Sarti E, Wilson M, Flisser A (1992) Neurocysticercosis in an orthodox jewish community in New York city. *N Engl J Med* 327:692-695.
- Scharf D (1988) Neurocysticercosis. *Arch Neurol* 45:777-780.
- Simac C, Michel P, Andriantsinrahavandy A, Esterre P, Michault A (1995) Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis. *Parasitol Res* 81:132-136.
- Sorvillo FJ, Waterman SH, Richards FO, Schantz PM (1992) Cysticercosis surveillance: Locally-acquired and travel-related infection and detection of intestinal tapeworm carriers in Los Angeles. *Am J Trop Med Hyg* 47:365-371.
- Spina-França A, Livramento JA, Machado LR (1993) Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). *Arq Neuropsiquiat* 51:16-20.
- Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE (1989) A enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis* 159:50-59.
- Weinberg M (1909) Recherche des anticorps spécifiques dans le distomatose et la cysticercose. *C R Soc Biol (Paris)* 66: 219-21.
- White ACJr (1997) Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin Infect Dis* 24:101-115.
- White ACJr, Robinson P, Kuhn R (1997) *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and immune response. In: *Immunopathogenetic Aspects of Disease Induced by Helminth Parasites*. Ed, Freedman DO. Chem. Immunol. Basel. Karger vol 66, pp. 209-230.

Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, Tsang VCW (1991) Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis* 64:1007-1009.

Youden WJ (1950) Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3:32-35.

Zini D, Farrell VJR, Wadee AA (1990) The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53:656-61.

TABLE 1. Specific antigenic activity and cross reactivity of WECC and purified fractions obtained by exchange chromatography on DEAE-Sephacel.

Material	Absorbance (492 nm)		Absorbance ratio
	CCP	HIP	CCP/HIP
WECC	1.28	0.09	14.2
PCF I	1.42	0.03	47.3
PCF II	1.05	0.05	21.0
PCF III	0.97	0.09	10.7

WECC = whole extract of *C. cellulosae*; PCF I = purified fraction obtained with 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 (Tris buffer); PCF II = purified fraction obtained with Tris buffer containing 0.25 M NaCl; PCF III = purified fraction obtained with Tris-buffer containing 1 M NaCl; CCP = pool of sera from patients with cysticercosis; HIP = pool of sera from patients with heterologous infections.

TABLE 2. Results of PCF-ELISA and WECC-ELISA in patients with neurocysticercosis and heterologous infections.

Tests	Positive reactions		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Neurocysticercosis (n = 57)	Heterologous infections (n = 50)		
PCF-ELISA	54/57	0/50	95	100
WECC-ELISA	54/57	4/50	95	92

PCF-ELISA = immunoenzymatic test standardized with a purified *C. cellulosae* fraction;
WECC-ELISA = immunoenzymatic test using a whole extract from *C. cellulosae*.

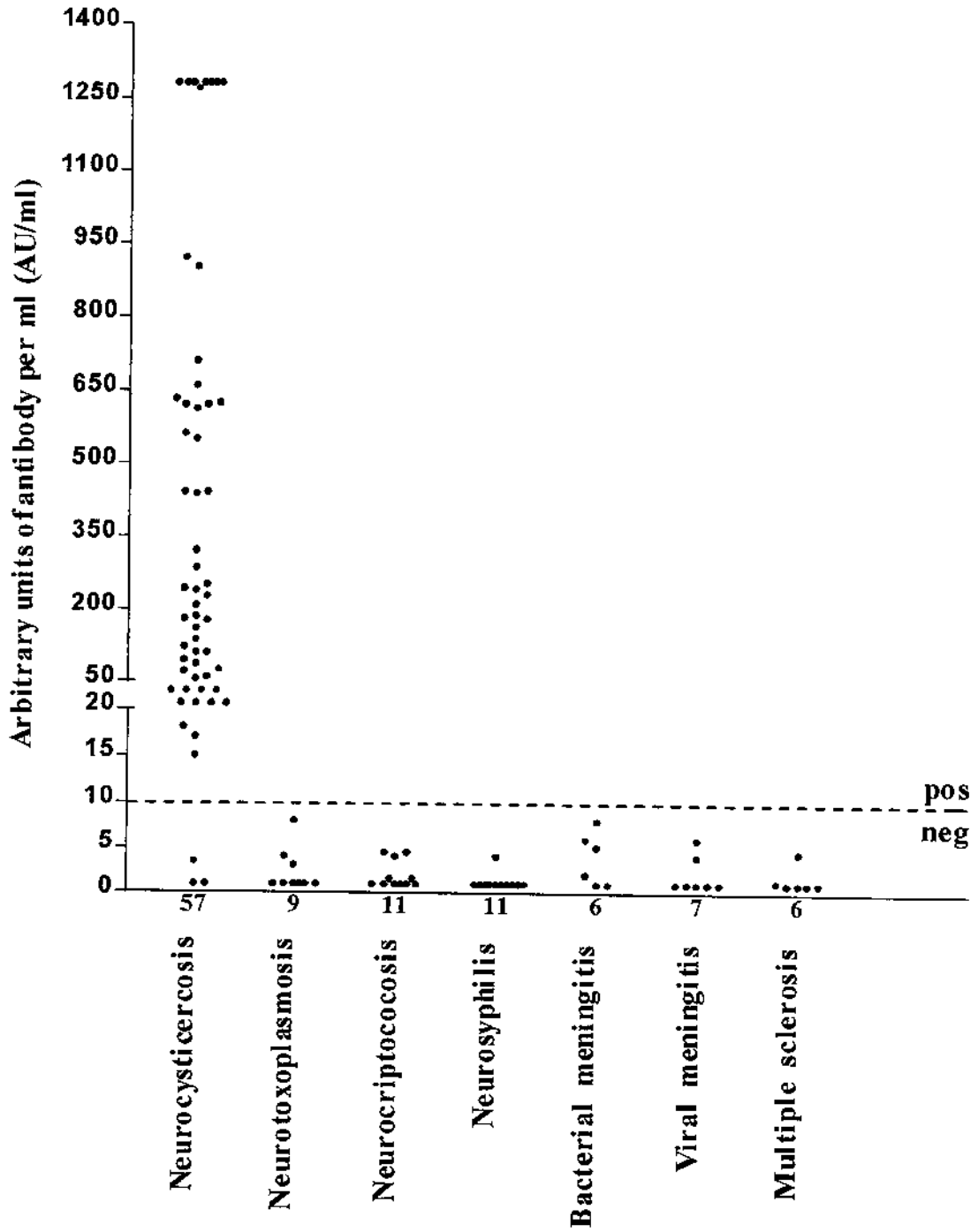


Figure 1. Results of the assay of 107 cerebrospinal fluid (CSF) samples by PCF-ELISA. The x axis shows the group of patients and the number of CSF samples tested in each group. The y axis shows the test results expressed as arbitrary units per ml (AU/ml).

3. DISCUSSÃO

A neurocisticercose destaca-se entre as doenças inflamatórias crônicas do SNC pela alta incidência, pela gravidade das lesões, pela falta de manifestações clínicas patognomônicas, pela dificuldade de estabelecimento do diagnóstico e pela dificuldade profilática e terapêutica.

As interações parasita-hospedeiro na cisticercose são de natureza complexa, em função dos antígenos parasitários em diferentes estágios de evolução e das variações genéticas individuais que influenciam a resposta imune do hospedeiro, dificultando a compreensão da dinâmica de sobrevivência do parasita e dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Ao se instalar no SNC, a oncosfera provoca uma reação inflamatória discreta do tipo alérgica. A reação inflamatória mais intensa é observada com a morte do cisticerco, quando há a liberação de substâncias imunogênicas. Nesta fase, há recrutamento de eosinófilos e neutrófilos, acompanhada de alterações na barreira hematoencefálica, determinando manifestações clínicas e sinalização liquórica, podendo repercutir nos testes imunológicos e nos de imagem. A fase seguinte corresponde ao processo de degeneração e posterior calcificação do parasita (WITTIG, 1996). Anticorpos da classe IgG são os mais freqüentes em LCR de pacientes com neurocisticercose e podem estar presentes em altas concentrações (LIVRAMENTO, 1987; VAZ, 1993).

No SNC, os cisticercos podem se alojar no parênquima, espaço subaracnóide ou sistema ventricular e, em parte, a localização determina a apresentação clínica. Os sintomas e sinais clínicos são manifestações de três processos patofisiológicos principais causados pelo parasita: o efeito de massa, a resposta inflamatória e a obstrução dos forâmenes e sistema ventricular do cérebro (NASH & NEVA, 1984). Pouca resposta inflamatória é encontrada ao redor dos cistos até que a morte e degeneração dos parasitas começa, o que explica em alguns casos, o longo intervalo entre a infecção e o desenvolvimento das manifestações clínicas (SHANLEY & JORDAN, 1980; NASH & NEVA, 1984). Muitas vezes, há múltiplos cistos em diferentes locais, de modo que a sintomatologia pode ser muito variada, sugerindo diagnósticos neurológicos e psiquiátricos diversos. A resposta imune do hospedeiro, na neurocisticercose, pode variar de uma remarcada tolerância ao parasita a uma severa reação inflamatória. As razões para estas diferenças não estão totalmente esclarecidas, principalmente no tocante à resposta imune celular (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 1996; WHITE, 1997).

O diagnóstico da neurocisticercose é baseado em dados clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e de imagem. Os métodos laboratoriais de análise do LCR e as técnicas de imagem melhoraram a precisão do diagnóstico, fornecendo informações da localização dos cisticercos, do grau de reação inflamatória e da resposta imune específica do hospedeiro. A TC e RMN são consideradas técnicas confiáveis para o diagnóstico da neurocisticercose, fornecendo, também, informações úteis com relação ao prognóstico e à evolução da infecção. Embora as técnicas de imagem, comumente, apresentem alta sensibilidade, em algumas circunstâncias, o diagnóstico diferencial é importante. A TC e a RMN apresentam baixa sensibilidade para a detecção de lesões únicas e de pequenas lesões calcificadas, respectivamente (ALMEIDA-PINTO *et al.*, 1988; PALACIOS *et al.*, 1997; GARG, 1998). Além disto, o alto custo dos aparelhos utilizados na TC e RMN, a manutenção técnica difícil e os gastos operacionais elevados, fazem com que as técnicas de imagem sejam, praticamente, inacessíveis para países em desenvolvimento, onde a incidência da neurocisticercose é bastante alta. Diante disto, diversos grupos de pesquisa que estudam neurocisticercose têm salientado a importância da pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae*.

A análise do LCR possibilita a detecção de anticorpos específicos contra a larva *C. cellulosae* por intermédio de testes imunológicos, além da avaliação da resposta inflamatória do hospedeiro, pelos estudos bioquímicos e citológicos. Praticamente todos os testes imunológicos convencionais têm sido utilizados na pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae* no soro e no LCR. Mesmo utilizando os testes mais sensíveis, em vários estudos há uma proporção significativa de indivíduos doentes sem anticorpos demonstráveis. Várias hipóteses têm sido aventadas para explicar a ausência de anticorpos específicos na cisticercose: efeito imunossupressor do tratamento frequentemente administrado aos pacientes, evasão da resposta imune por parte do parasita e a existência de diferentes sorotipos entre os cisticercos (FLISSER, WOODHOUSE, LARRALDE, 1980; LIVRAMENTO, 1987; MACHADO, 1987). Além disto, a resposta imune do hospedeiro depende do número, localização e estágio de evolução dos cisticercos no SNC (FLISSER, PÉREZ-MONTFORT, LARRALDE, 1979; FLISSER *et al.*, 1980; CORONA *et al.*, 1986; LIVRAMENTO, 1987; CHANG *et al.*, 1988; ZINI, FARRELL, WADEE, 1990; WILSON *et al.*, 1991; SLOAN, SCHNEIDER, ROSENBLATT, 1995). Por outro lado, as técnicas

imunológicas utilizadas para o imunodiagnóstico da neurocisticercose podem apresentar resultados falso positivos, em consequência das reações cruzadas com outros parasitas e pelo fato da larva (*C. cellulosae*) compartilhar antígenos com o verme adulto (*T. solium*) (CORREA *et al.*, 1989; SLOAN *et al.*, 1995).

Uma grande variedade de técnicas imunológicas tem sido utilizadas para a pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae*. O desempenho das técnicas imunoenzimáticas tem se mostrado superior ao de outras técnicas desenvolvidas para o imunodiagnóstico da neurocisticercose (ROSAS *et al.*, 1986; TSANG *et al.*, 1989; FELDMAN *et al.*, 1990; SIMAC *et al.*, 1995; GARCIA *et al.*, 1998). Entretanto, variações significativas são, usualmente, observadas nos resultados das técnicas imunoenzimáticas para neurocisticercose. Essas variações são esperadas e, provavelmente, estão relacionadas a vários fatores, incluindo a heterogeneidade dos pacientes incluídos no estudo, o estado imune dos pacientes na época de coleta das amostras de sangue e/ou LCR, as propriedades intrínsecas das técnicas, a preparação antigênica, o conjugado e o substrato utilizados nos procedimentos e o método de cálculo do valor de "cut-off" das reações. Técnicas de ELISA utilizando extratos brutos de *C. cellulosae*, embora com alta sensibilidade, podem apresentar porcentagem significativa de reações cruzadas (ESPINOZA *et al.*, 1986; ROSAS *et al.*, 1986; CORREA *et al.*, 1989; NG & KO, 1994). As técnicas de Imunoblot, pela possibilidade de identificação de bandas protéicas características em extratos brutos do parasita ou em frações purificadas, geralmente, apresentam maior especificidade do que as técnicas de ELISA. Tsang *et al.* (1989) desenvolveram uma técnica de Imunoblot para a pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae* em que utilizavam uma preparação antigênica composta de glicoproteínas isoladas do extrato bruto de cisticercos por cromatografia de afinidade com Sepharose-lentil-lectina. Analisando 532 amostras de soros (111 de pacientes com cisticercose, 367 de pacientes com infecções heterólogas e 54 de pessoas saudáveis) e 46 amostras de LCR (37 de pacientes com neurocisticercose e 9 de pacientes com infecções heterólogas) a técnica apresentou 98% de sensibilidade e 100% de especificidade. Diaz *et al.* (1992) compararam os resultados obtidos entre uma técnica de ELISA padronizada com um extrato bruto de cisticercos e a técnica de Imunoblot desenvolvida por Tsang *et al.* (1989). Analisando uma bateria de 193 amostras de soros (34 de pacientes com cisticercose, 97 de pacientes com infecções heterólogas e 62 de pessoas saudáveis), a técnica

de ELISA apresentou 65% de sensibilidade e 63% de especificidade, enquanto que a técnica de Imunoblot mostrou 94% de sensibilidade e 100 % de especificidade. Ainda que as técnicas de Imunoblot apresentem maior eficácia do que as técnicas de ELISA, principalmente com relação à especificidade, a sua complexidade e seu custo elevado têm dificultado a sua utilização no imunodiagnóstico da neurocisticercose. Neste contexto, a utilização de antígenos purificados, apresentando alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada, adequados às técnicas de ELISA, poderia representar um avanço importante para o imunodiagnóstico da neurocisticercose.

A grande maioria das reações imunoenzimáticas utilizadas para o diagnóstico da neurocisticercose são qualitativas ou, no máximo, semi-quantitativas. O objetivo do nosso estudo foi o desenvolvimento de uma técnica de ELISA quantitativa para o imunodiagnóstico da neurocisticercose, utilizando um antígeno que apresentasse alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada. Para isto, cisticercos de *T. solium* foram submetidos aos processos de homogeneização, sonicação e centrifugação para a obtenção do extrato bruto de cisticercos (EBCC). Com o intuito de se encontrar frações do parasita com alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada, o EBCC foi fracionado por meio de cromatografias de troca iônica em colunas de DEAE-Celulose e DEAE-Sephacel. O fracionamento do EBCC, em cada processo cromatográfico, resultou em três frações, eluídas com concentrações salinas crescentes. A atividade antigênica específica e a reatividade cruzada do EBCC e das frações cromatográficas obtidas foram avaliadas, por meio da técnica de ELISA padronizada, utilizando um "pool" de soros de pacientes com cisticercose (PCC) e um "pool" de soros de pacientes com infecções heterólogas (PIH). O fracionamento do EBCC por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel produziu uma fração (FPC I) que apresentou uma relação entre as absorvâncias obtidas com PCC e PIH, pelo menos 3 vezes maior do que a obtida com o EBCC. Quando o EBCC e a fração FPC I foram testados com padrões séricos, contendo diferentes concentrações de anticorpos, variando de 1 a 1.280 unidades arbitrárias de anticorpos por ml (UA/ml), as absorvâncias obtidas com a fração FPC I foram significativamente maiores que as obtidas com o EBCC ($p = 0$), utilizando o teste não-paramétrico de Wilcoxon (CONOVER, 1971). A técnica de ELISA quantitativa com a fração FPC I (ELISA-FPC) foi comparada com uma técnica de ELISA qualitativa

utilizando como antígeno um extrato bruto de *C. cellulosa* (ELISA-EBCC). Para isto, foram testadas 57 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose e 50 de pacientes com infecções heterólogas (neurosífilis, neurocriptococose, neurotoxoplasmose, esclerose múltipla, meningites bacteriana e viral). A classe de imunoglobulinas estudada foi a IgG, pela sua maior concentração e produção em infecções do SNC.

Para a padronização das técnicas de ELISA, realizaram-se titulações das preparações antigênicas (EBCC e FPC I), do conjugado (anticorpos anti-IgG humana marcados com peroxidase) e estudos da taxa de conversão do sistema substrato (orto-fenilenodiamina/peróxido de hidrogênio). Na técnica quantitativa (ELISA-FPC), em toda placa de reação, foram colocados padrões contendo concentrações de anticorpos que variavam de 1 a 1.280 UA/ml. A curva gerada pelo ensaio dos padrões foi utilizada para converter as densidades ópticas das reações em UA/ml e o cálculo do "cut-off" foi realizado utilizando o índice J (YOU DEN, 1950). O "cut-off" da técnica qualitativa (ELISA-EBCC) foi definido como a média dos resultados obtidos com o grupo de infecções heterólogas mais dois desvios-padrão.

As técnicas ELISA-FPC e ELISA-EBCC apresentaram sensibilidade de 95%. Três pacientes com neurocisticercose, de um total de 57 pacientes estudados, apresentaram níveis não significativos de anticorpos com as duas técnicas. O primeiro paciente apresentava amostra de LCR com concentração baixa de IgG total (3,5 mg/dl) e número normal de leucócitos e TC com vários cistos calcificados. O segundo paciente apresentava amostra de LCR com concentração baixa de IgG total (3,1 mg/dl) e número alterado de leucócitos ($320/\text{mm}^3$), com predomínio de eosinófilos e linfócitos (57% de eosinófilos, 41% de linfócitos, 1% de monócitos e 1% de basófilos) e TC com um único cisto viável no córtex cerebral. O terceiro paciente apresentava amostra de LCR com concentração elevada de IgG total (62,1 mg/dl) e número alterado de leucócitos ($213/\text{mm}^3$), com predomínio de linfócitos (98% de linfócitos e 2% de eosinófilos) e TC com vários cistos calcificados. Estes três pacientes com resultados falso negativos apresentavam níveis significativos de anticorpos anti - *C. cellulosa*, detectados por ELISA ou IFI, em amostras de LCR coletadas três anos antes do presente estudo.

Dois dos três pacientes com neurocisticercose que apresentaram resultados falso negativos com as duas técnicas de ELISA possuíam TC somente com cistos calcificados, enquanto que o outro apresentava um único cisto viável situado no córtex cerebral. Alguns estudos correlacionam o número, a localização e o estágio evolutivo dos cistos com os resultados obtidos em reações imunológicas para a pesquisa de anticorpos anti - *C. cellulosae*. Chang *et al.* (1988), utilizando uma técnica de ELISA padronizada com o líquido vesicular de cisticercos, pesquisaram a presença de anticorpos anti - *C. cellulosae* em amostras de soros e LCR de 69 pacientes com neurocisticercose, comprovada por TC, apresentando cistos em diferentes estágios de evolução. Sessenta e três pacientes que possuíam cistos viáveis e/ou em processo de degeneração apresentaram amostras de soros e/ou LCR reagentes, enquanto que 6 pacientes com apenas cistos calcificados apresentaram amostras de soro e LCR não reagentes. A resposta imune na neurocisticercose pode ser induzida por antígenos de superfície, de estrutura interna e de excreção-secreção durante as fases de desenvolvimento e degeneração dos cisticercos. A menor reatividade das técnicas imunológicas em pacientes apresentando somente cistos calcificados, presumivelmente, reflete a ausência de estimulação antigênica (WILSON *et al.*, 1991). Zini *et al.* (1990) pesquisaram a presença de anticorpos anti - *C. cellulosae* em amostras de soros e LCR de 100 pacientes com neurocisticercose, utilizando uma técnica de ELISA na qual o líquido vesicular dos cisticercos foi usado como antígeno. Os autores mostraram que o nível de anticorpos específicos dependia da posição anatômica dos cisticercos no SNC. Níveis elevados de anticorpos foram detectados nas amostras de LCR de pacientes com cistos localizados na base do cérebro, nas cisternas principais ou dentro dos ventrículos, enquanto que a maioria das amostras de LCR de pacientes com cistos localizados no córtex cerebral apresentaram baixos níveis ou ausência de anticorpos. Embora a razão para a maior intensidade da resposta imune em pacientes com cistos localizados em algumas regiões anatômicas não seja clara, acredita-se que esses sítios possam representar áreas em que os linfócitos possam ter um acesso mais facilitado ao cérebro (LINK, 1979; ZINI *et al.*, 1990).

No nosso trabalho, foram pesquisados somente anticorpos IgG anti - *C. cellulosae*. Alguns estudos, em pacientes com neurocisticercose, têm mostrado a detecção de outras classes de anticorpos específicos na ausência de anticorpos da classe IgG (FLISSER *et al.*, 1979; FLISSER *et al.*, 1980; ROSAS *et al.*, 1986).

A análise dos resultados obtidos no grupo de 50 pacientes com infecções heterólogas mostrou que a técnica ELISA-FPC apresentou melhor desempenho (100% de especificidade) do que a técnica ELISA-EBCC (92% de especificidade). Quatro pacientes com infecções heterólogas, dois pacientes com neurotoxoplasmose e dois com meningite bacteriana, apresentaram resultados falso positivos com a técnica ELISA-EBCC. Estes quatro pacientes possuíam TC sem sinais ou lesões sugestivas de neurocisticercose. Os dois pacientes com neurotoxoplasmose tinham manifestações clínicas sugestivas de infecção toxoplásmica. Um dos pacientes, uma criança de 3 anos, apresentava reação em cadeia da polimerase (PCR) positiva para toxoplasmose no sangue e amostra de LCR com níveis significativos de anticorpos anti - *Toxoplasma gondii*, detectados por IFI (IgM 1/16; IgG 1/512). O outro paciente, com 28 anos de idade, apresentava amostra de LCR com níveis significativos de anticorpos IgG anti- *T. gondii* (1/64), detectados por IFI. Um dos pacientes com meningite bacteriana, 27 anos de idade, portador do vírus HIV, apresentava sintomas clínicos de meningite, cultura do LCR positiva para *Mycobacterium tuberculosis*, dosagem de adenosina deaminase líquórica elevada, assim como TC com sinais de meningite. O segundo paciente com meningite bacteriana, 36 anos de idade, apresentava cultura positiva para *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus epidermidis*, com citologia global e diferencial, além de parâmetros bioquímicos, compatíveis com meningite bacteriana. Três anos antes, o paciente havia sido submetido a uma neurocirurgia, devido a um hematoma subdural, evoluindo posteriormente para piora da hipertensão intracraniana, sendo necessária a instalação de uma válvula de derivação do LCR.

Em nosso estudo, as 3 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose que apresentaram resultados falso negativos com as técnicas ELISA-FPC e ELISA-EBCC e as 4 amostras de LCR de pacientes com infecções heterólogas que apresentaram resultados falso positivos com a técnica de ELISA-EBCC foram negativas, quando testadas com a técnica de Imunoblot descrita por Tsang *et al.* (1989). Em 1991, Wilson *et al.* mostraram que a sensibilidade desta técnica de Imunoblot dependia do número e estágio evolutivo dos cisticercos no SNC. Em amostras de soro e LCR de 50 pacientes com neurocisticercose, comprovada por métodos anatomopatológicos, com número variável de cistos no SNC, detectados por TC e/ou RMN, a técnica de Imunoblot foi positiva em 30 (94%) de 32 pacientes apresentando dois ou mais cistos e em 5 (28%) de 18 pacientes com um único

cisto. Os autores pesquisaram, também, a presença de anticorpos anti - *C. cellulosae* em amostras de soros e LCR de 127 pacientes com neurocisticercose, comprovada por métodos anatomopatológicos ou por técnicas de imagem, com número variável de cistos em diferentes estágios de evolução, detectados por TC e/ou RMN. Em 23 pacientes apresentando um único cisto, a técnica de Imunoblot foi positiva em 15 amostras de soros e 8 amostras de LCR. Em 104 pacientes apresentando dois ou mais cistos, a técnica foi positiva em 95 amostras de soros e 84 amostras de LCR. Um número significativo de resultados falso negativos foi encontrado em pacientes apresentando somente cistos calcificados. Em 5 pacientes com um único cisto calcificado, a técnica foi negativa em 3 amostras de soros e 4 amostras de LCR. Em 30 pacientes com dois ou mais cistos calcificados, a técnica foi negativa em 3 amostras de soros e 6 amostras de LCR.

A utilização de antígenos como reagentes sorológicos, para a pesquisa de anticorpos específicos, requer que os mesmos possuam algumas características. É importante que os antígenos sejam obtidos em quantidades suficientemente grandes com relativa facilidade, sejam estáveis sob condições usuais de armazenamento, contenham componentes antigênicos reconhecidos pelo maior número possível de pessoas infectadas, não apresentem ou apresentem quantidades mínimas de componentes capazes de serem reconhecidos por anticorpos induzidos por infecções heterólogas e tenham compatibilidade com o sistema de análise empregado. Assim, a seleção de um teste imunológico depende de uma combinação de variáveis, incluindo sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, custo, facilidade de execução e rapidez. A fração FPC I, obtida pelo fracionamento do extrato bruto de *C. cellulosae* em DEAE-Sephacel, apresentou grande quantidade de componentes específicos e quantidades mínimas de materiais não específicos. Em nosso estudo, a técnica de ELISA-FPC, utilizando amostras de LCR para pesquisa de anticorpos IgG anti - *C. cellulosae*, apresentou 95% de sensibilidade e 100% de especificidade.

As preparações antigênicas utilizadas no imunodiagnóstico da neurocisticercose são, tradicionalmente, derivadas de cisticercos de *T. solium* extraídos da carne de porcos infectados com o parasita. Entretanto, nos últimos anos, tem havido uma dificuldade crescente na obtenção de porcos infectados para a preparação de antígenos. Deste modo, estudos de fracionamento do *C. cellulosae* devem levar em consideração o rendimento das frações obtidas. Ito *et al.* (1998) desenvolveram técnicas de ELISA e Imunoblot com

preparações antigênicas glicoprotéicas purificadas, a partir do extrato bruto ou líquido vesicular de *C. cellulosae*, por meio de focalização isoelétrica. Analisando uma bateria de 189 amostras de soros (53 de pacientes com neurocisticercose, 107 de pacientes com infecções heterólogas e 29 de pessoas saudáveis), as técnicas apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade. Apesar dos excelentes resultados, o rendimento das preparações antigênicas purificadas por focalização isoelétrica é, normalmente, muito pequeno, encarecendo o custo da reação. Em nosso estudo, com base em duas cromatografias do EBCC em DEAE-Sephacel, o rendimento da fração FPC I, em termos de proteína total, foi de 57%. Dada a dificuldade de obtenção de cisticercos de *T. solium*, alternativamente, nos últimos anos, vários autores têm sugerido a utilização de cisticercos de *Taenia crassiceps* (*Cysticercus longicollis*) para a preparação de antígenos para o imunodiagnóstico da neurocisticercose (LARRALDE *et al.*, 1990; VAZ, 1993; GARCIA, ORDOÑEZ, SOTELO, 1995; ANDRADE *et al.*, 1996; VAZ *et al.*, 1996; FERREIRA *et al.*, 1997; VAZ *et al.*, 1997).

O custo de uma reação imunológica, como já salientado, é um dos fatores a ser levado em consideração, quando se planeja incluir a mesma numa rotina laboratorial. O custo da reação ELISA-FPC para o imunodiagnóstico da neurocisticercose é de, aproximadamente, R\$ 3,50 (US\$ 1,80), para amostras de LCR testadas em duplicata.

No Brasil, a neurocisticercose, antes mais restrita às regiões sul e sudeste, começou a difundir-se para todo país, principalmente, em decorrência da falta de uma profilaxia adequada. As principais medidas de controle do complexo teníase-cisticercose são o diagnóstico e o tratamento do portador do verme adulto, fiscalização das criações de suínos e condições sanitárias que impeçam a contaminação fecal da água e dos alimentos (VAZ, 1996).

Os dados obtidos neste trabalho, bem como a revisão da literatura, mostram que a utilização de antígenos purificados, em métodos imunológicos, pode aumentar a eficiência e, conseqüentemente, a confiabilidade no imunodiagnóstico da neurocisticercose. O bom desempenho em termos de sensibilidade e especificidade, aliado ao baixo custo, indicam que a técnica ELISA-FPC pode ser de grande utilidade para o imunodiagnóstico da neurocisticercose.

4. CONCLUSÕES

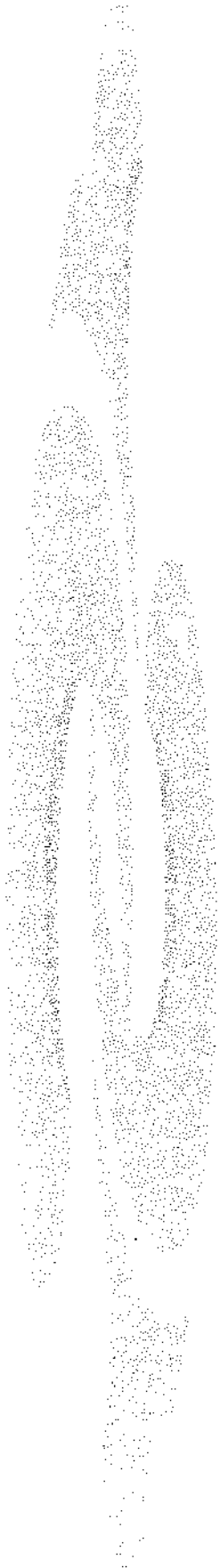
O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma técnica imunoenzimática (ELISA) quantitativa para o imunodiagnóstico da neurocisticercose.

Os resultados do nosso trabalho permitem as seguintes conclusões:

1 O fracionamento do extrato bruto de *C. cellulosae*, por meio de cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, permitiu a purificação de uma fração do parasita (FPC I), apresentando alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada.

2 O desenvolvimento de uma técnica de ELISA quantitativa utilizando como antígeno a fração FPC I (ELISA-FPC) apresentou 95% de sensibilidade e 100% de especificidade para o imunodiagnóstico da neurocisticercose, em amostras de líquido cefalorraquidiano.

3 O bom desempenho, em termos de sensibilidade e especificidade, aliado ao baixo custo, indicam que a técnica ELISA-FPC pode ser de grande utilidade para o imunodiagnóstico da neurocisticercose.



5. SUMMARY

Cysticercosis is an important health problem in many Asia, Africa and Latin America countries which have inadequate sanitary conditions, as well as in some industrialized nations with a high immigrant population from disease-endemic areas. In South America, high frequencies of this disease have been reported in Peru, Chile and Brazil.

Cysticercosis is caused by infection with the larval form (cysticercus) of the tapeworm *Taenia solium*. The cysticerci may be located in areas where they produce no symptoms, such as muscle or cutaneous tissues. On the other hand, the presence of cysticerci in the central nervous system (CNS), a condition known as neurocysticercosis, can cause seizures and other neurological problems. The clinical signs and symptoms of neurocysticercosis are variable and non-specific, leading to different neurological and psychiatric diagnoses. Thus, a definitive diagnosis of neurocysticercosis should always be considered in an epidemiological context and confirmed by laboratory and neuroimaging data.

The methods used for diagnosing neurocysticercosis include neuroimaging techniques (computed tomography and nuclear magnetic resonance) and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. Neuroimaging techniques have contributed to a more accurate diagnosis and a better understanding of the pathophysiology of neurocysticercosis. However, because of their high cost and restricted availability, these procedures may be of limited use in developing countries with high rates of infection. The detection of specific antibodies against *Cysticercus cellulosae* antigens in CSF samples from patients suspected of having neurocysticercosis is a useful tool for diagnosing the disease, especially when neuroimaging techniques are not available or inconclusive.

In the present study, a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis is described. The ELISA was standardized using a purified *C. cellulosae* fraction (PCF I) obtained by ion exchange chromatography. The ELISA using PCF I (PCF-ELISA) and a qualitative ELISA using a whole extract from *C. cellulosae* (WECC-ELISA) were used to screen for *Cysticercus*-specific IgG antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) samples from 57 patients with neurocysticercosis and 50 patients with heterologous infections. The sensitivity of both

assays was 95%, whereas the specificities of PCF-ELISA and WECC-ELISA were 100% and 92%, respectively. The excellent sensitivity and specificity of the PCF-ELISA make this assay a potentially useful tool in screening for antibodies against *C. cellulosa*.



***6. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- ACHA, P.N. & AGUILAR, F.J. - Studies on cysticercosis in Central America and Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **13**: 48-53, 1964.
- AGAPEJEV, S. - Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **38**: 207-16, 1996.
- ALMEIDA-PINTO, J.; VEIGA-PIRES, J.A.; STOCKER, A.; COELHO, T.; MONTEIRO, L. - Cysticercosis of the brain: the value of computed tomography. **Acta Radiol.**, **29**: 625-8, 1988.
- ANDRADE, A.P.F.; VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; PALOU, V.S.E.B.; CUNHA, R.A.F.; FERREIRA, A.W. - Immunoperoxidase for the detection of antibodies in cerebrospinal fluid in neurocysticercosis: use of *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus longicollis* particles fixed on microscopy slides. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **38**: 259-63, 1996.
- ARAMBULO III, P.V.; WALLS, K.W.; BULLOCK, S.; KAGAN, I.G. - Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). **Acta Trop.**, **35**: 63-7, 1978.
- BASSI, G.E.; CAMARGO, M.E.; BITTENCOURT, J.M.T.; GUARNIERI, D.B. - Reação de imunofluorescência com antígenos de *Cysticercus cellulosae* no líquido cefalorraqueano. **Neurobiologia**, **42**: 165-70, 1979a.
- BASSI, G.E.; CAMARGO, M.E.; BITTENCOURT, J.M.T.; SANTIAGO, M.F.; CERQUEIRA, F.E.C. - Comparação entre as reações de fixação de complemento e imunofluorescência em líquidos cefalorraquianos **Neurobiologia**, **42**: 231-8, 1979b.
- BIAGI, F.F. & PINHÃ A.P. - Presence of antigens in calcareous corpuscles of cysticercus. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **6**: 114-6, 1964.
- BIAGI, F.F. & TAY, J. - A precipitation reaction for the diagnosis of cysticercosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **7**: 63-5, 1958.

- BONAMETTI, A.M.; BASILE, M.A.; VAZ, A.J.; BALDY, J.L.S.; TAKIGUTI, C.K. - Índice de positividade da reação imunoenzimática (ELISA) para cisticercose no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro de pacientes com epilepsia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **34**: 451-8, 1992.
- CARPIO, A.; PLACENCIA, M.; SANTILLÁN, F.; ESCOBAR, A. - A proposal for classification of neurocysticercosis. **Can. J. Neurol. Sci.**, **21**: 43-7, 1994.
- CASTILLO, M.; SALGADO, P.; ROJAS, R.; SOTELO, J.; SANCHEZ, J.; MUKHERJI, S.K. - Unusual imaging manifestations of neurocysticercosis. **Int. J. Neuroradiol.**, **2**: 168-75, 1996.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL – **Locally-acquired neurocysticercosis - North Carolina, Massachusetts and South Carolina, 1989-1991**. Atlanta, MMWR, 1992a, 41: 1-4.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL - **Update: International task force for disease eradication**. Atlanta, MMWR, 1992b, 41: 697-8.
- CHANDY, M.J.; RAJSHEKHAR, V.; PRAKASH, S.; GHOSH, S.; JOSEPH, T.; ABRAHAM, J.; CHANDI, S.M. - Cysticercosis causing single, small CT lesions in Indian patients with seizures. **Lancet**, **18**: 390-1, 1989. [Letter].
- CHANG, K.H.; KIM, W.S.; CHO, S.Y.; HAN, M.C.; KIM, C.W. - Comparative evaluation of brain CT and ELISA in the diagnosis of human neurocysticercosis. **Am. J. Neuroradiol.**, **9**: 125-30, 1988.
- CONOVER, W.J. In: WILEY, J.& SONS, ed. – **Practical nonparametric statistics**. New York, 1971. p. 1-462.
- CORONA, T.; PASCOE, D.; GONZALÉS-BARRANCO, D.; ABAD, P.; LANDA, L.; ESTAÑOL, B. - Anticysticercous antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, **49**: 1044-9, 1986.

- CORREA, D.; SANDOVAL, M.A.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, M.E.; PLANCARTE, A.; MEZA-LUCAS, A.; FLISSER, A. - Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **83**: 814-6, 1989.
- COULDWELL, W.T.; CHANDRASOMA, P.; APUZZO, M.L.J.; ZEE, C-S. - Third ventricular cysticercal cyst mimicking a colloid cyst: case report. **Neurosurgery**, **37**: 1200-3, 1995.
- DEL BRUTTO, O.H. - Neurocysticercosis. **Curr. Opin. Neurol.**, **10**: 268-72, 1997.
- DEL BRUTTO, O.H. & SOTELO, J. - Neurocysticercosis: An update. **Rev. Infect. Dis.**, **10**: 1075-87, 1988.
- DIAZ, J.F.; VERASTEGUI, M.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W.; PILCHER, J.B.; GALLO, C.; GARCIA, H.H.; TORRES, P.; MONTENEGRO, T.; MIRANDA, E.; The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **46**: 610-5, 1992.
- EARNEST, M.P.; RELLER, L.B.; FILLEY, C.M.; GREK, A.J. - Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review. **Rev. Infect. Dis.**, **9**: 961-79, 1987.
- ESCOBAR A. & NIETO, D. Parasitic diseases. In: MINCKLER, J., ed-. **Pathology of nervous system**. New York: McGraw-Hill, 1972. p. 2503-21.
- ESPINOZA, B.; RUIZ-PALACIOS, G.; TOVAR, A.; SANDOVAL, M.A.; PLANCARTE, A.; FLISSER, A. - Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, **24**: 536-41, 1986.

- FELDMAN, M.; PLANCARTE, A.; SANDOVAL, M.; WILSON, M.; FLISSER, A. - Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **84**: 559-62, 1990.
- FERREIRA, A.P.; VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; SASAKI, A.T.; FERREIRA, A.W.; LIVRAMENTO, J.A. - Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **39**: 29-33, 1997.
- FLISSER, A.; PÉREZ-MONTFORT, R.; LARRALDE, C. - The immunology of human and animal cysticercosis. **Bull. WHO**, **57**: 839-56, 1979.
- FLISSER, A.; WOODHOUSE, E.; LARRALDE, C. - Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. **Clin. Exper. Immunol.**, **39**:27-37, 1980.
- GARCIA, E.; ORDOÑEZ, G.; SOTELO, J. - Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western-blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 3324-5, 1995.
- GARCIA, E. & SOTELO, J. - A new complement fixation test for the diagnosis of neurocysticercosis in cerebrospinal fluid. **J. Neurol.**, **238**: 379-82, 1991.
- GARCIA, H.H.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; MONTENEGRO, T.; MARTINEZ, S.M.; TSANG, V.C.W.; GILMAN, R.H.; The Cysticercosis Working Group in Peru. - A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **92**: 411-4, 1998.
- GARG, R.K. Neurocysticercosis. **Postgrad. Med. F.**, **74**: 321-6, 1998.
- HANCOCK, K. & TSANG, V.C.W. - Development and optimization of the Fast-Elisa for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol. Methods**, **92**:167-76, 1986.

- ITO, A.; PLANCARTE, A.; MA, L.; KONG, Y.; FLISSER, A.; CHO, S.Y.; LIU, Y.H.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M.W.; SCHANTZ, P.M. - Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, **59**: 291-4, 1998.
- KRAMER, L.D.; LOCKE, G.E.; BYRD, S.E.; DARYABAGI, J. - Cerebral cysticercosis: documentation of natural history with CT. **Radiology**, **171**: 459-62, 1989.
- LANGE, O. - Síndrome líquórica da cisticercose encéfalo-meníngea. **Rev. Neurol. Psychiat. São Paulo**, **6**: 35-47, 1940.
- LARRALDE, C.; SOTELO, J.; MONTOYA, R.M.; PALENCIA, G.; PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; DIAZ, M.L.; SCIUTTO, E. - Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **114**: 926-8, 1990.
- LINK, H. - Some aspects of immune reactions of the brain. In: ROSE, F.C., ed. - **Clinical Neuroimmunology**. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1979, p. 12-28.
- LIVRAMENTO, J.A. - **Síndrome do líquido cefalorraqueano na neurocisticercose – estudo crítico sobre a evolução da imunidade humoral**. São Paulo, 1986. [Tese de Livre-Docência — Faculdade de Medicina da Faculdade de São Paulo].
- LIVRAMENTO, J.A. - Síndrome do líquido cefalorraqueano na neurocisticercose. **Arq. Neuropsiquiatr.**, **45**: 261-75, 1987.
- MACHADO, A.B.B.; PIALARISSI, C.S.M.; VAZ, A.J. - Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral, São Paulo, S. P. (Brasil). **Rev. Saúde Pública**, **22**: 240-4, 1988.
- MACHADO, L.R. - Líquido cefalorraqueano e neurocisticercose: aspectos evolutivos da resposta inflamatória celular. **Arq. Neuropsiquiatr.**, **45**: 353-63, 1987.

- MACHADO, L.R. - Neurocisticercose: exame de líquido cefalorraqueano. In: MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; SPINA-FRANÇA, A.; NÓBREGA, J.P.S., ed. - **Neuroinfecção**, 96. São Paulo, Clínica Neurológica HC/FMUSP, 1996, p. 205-12.
- MADDISON, S.E. - The present status of serodiagnosis and seroepidemiology of schistosomiasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 7: 93-105, 1987.
- MILLER, B.L.; STANGAITIS, S.M.; TOURTELLOTTE, W.W.; SHAPSHAK, P.; GOLDBERG, M.; HEINER, D.; WEIL, M. - Intra-blood-brain-barrier IgG synthesis in cerebral cysticercosis. **Arch. Neurol.**, 42: 782-4, 1985.
- MOSES, A. - Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cisticercoses. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 3: 320-7, 1911.
- NASCIMENTO, E.; NOGUEIRA, P.M.P.; TAVARES, C.A.P. - Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. **Parasitol. Res.**, 73: 446-50, 1987.
- NASH, T.E. & NEVA, F.A. - Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. **N. Engl. J. Med.**, 311: 1492-5, 1984.
- NG, T.F. & KO, R.C. - Serodiagnosis of cysticercosis: specificity of different antigens and enzyme-linked immunosorbent assays. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 88: 421-2, 1994.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L.; GARCIA-MENDOZA, E.; RIOS, C.; SOTELO, J. - Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. **Arch. Med. Res.**, 27: 513-7, 1996.
- PALACIOS, E.; LUJAMBIO, P.S.; JASSO, R.R. - Computed tomography and magnetic resonance imaging of neurocysticercosis. **Semin. Roentgenol.**, 32: 325-34, 1997.
- PETITHORY, J.; JAY, M.; FEILLET, M. - Le diagnostic par immunoelectrophorese et ouchterlony de la cysticercose. **Encéphale**, 60:24-35, 1971.

- PIALARISSI, C.S.M.; VAZ, A.J.; SOUZA, A.M.C.; NAKAMURA, P.M.; CAMARGO, E.D.; SILVA, M.V.; UEDA, M. - Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **29**: 367-73, 1987.
- PROCTOR, E.M.; POWELL, S.J.; ELSDON-DEW, R. - The serological diagnosis of cysticercosis. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, **60**: 146-51, 1966.
- RAJSHEKHAR, V. - Etiology and management of single small CT lesions in patients with seizures: understanding a controversy. **Acta Neurol. Scand.**, **84**: 465-70, 1991.
- RAMOS-KURI, M.; MONTOYA, R.M.; PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; DIAZ, M.L.; SCIUTTO, E.; SOTELO, J.; LARRALDE, C. - Immunodiagnosis of neurocysticercosis: Disappointing performance of serology (Enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients. **Arch. Neurol.**, **49**: 633-6, 1992.
- RANGEL, R.; TORRES, B.; DEL BRUTTO, O.H.; SOTELO, J. - Cysticercotic encephalitis: a severe form in young females. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **36**: 387-92, 1987.
- RESNICK, L.; MARZO-VERONESE, F.; SCHÜPBACH, J.; TOURTELLOTTE, W.W.; HO, D.D.; MÜLLER, F.; SHAPSHACK, P.; VOGT, M.; GROOPMAN, J.E.; MARKHAM, P.D.; GALLO, R.C. - Intra-blood-brain-barrier synthesis of HTLV-III-specific IgG in patients with neurologic symptoms associated with AIDS or AIDS-related-complex. **N. Engl. J. Med.**, **313**: 1498-504, 1985.
- ROSAS, N.; SOTELO, J.; NIETO, D. - ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. **Arch. Neurol.**, **43**: 353-6, 1986.
- SCHANTZ, P.M.; MOORE, A.C.; MUÑOZ, J.L.; HARTMAN, B.J.; SCHAEFER, J.A.; ARON, A.M.; PERSAUD, D.; SARTI, E.; WILSON, M.; FLISSER, A. - Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York City. **N. Engl. J. Med.**, **327**: 692-5, 1992.

- SCHARF, D. – Neurocysticercosis: Two hundred thirty-eight cases from a California hospital. *Arch. Neurol.*, **45**: 777-80, 1988.
- SCOTT, E.N.; KAUFMAN, L.; BROWN, A.C.; MUCHMORE, H.G. - Serologic studies in the diagnosis and management of meningitis due to *Sporothrix Schenckii*. *N. Engl. J. Med.*, **317**: 935-45, 1987.
- SHANLEY, J.D. & JORDAN, M.C. - Clinical aspects of CNS cysticercosis. *Arch. Intern. Med.*, **140**: 1309-13, 1980.
- SIMAC, C.; MICHEL, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; ESTERRE, P.; MICHAULT, A. - Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis. *Parasitol. Res.*, **81**: 132-6, 1995.
- SLOAN, L.; SCHNEIDER, S.; ROSENBLATT, J. – Evaluation of enzyme-linked immunoassay for serological diagnosis of cysticercosis. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 3124-8, 1995.
- SORVILLO, F.J.; WATERMAN, S.H.; RICHARDS, F.O.; SCHANTZ, P.M. - Cysticercosis surveillance: locally-acquired and travel-related infections and detection of intestinal tapeworm carriers in Los Angeles county. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **47**: 365-71, 1992.
- SOTELO, J.; GUERRERO, V.; RUBIO F. - Neurocysticercosis: A new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Arch. Intern. Med.*, **145**: 442-5, 1985.
- SPINA-FRANÇA, A. - Valor do exame eletroforético das do líquido cefalorraquidiano na cisticercose do sistema nervoso central. *Arq. Neuropsiquiatr.*, **18**: 301-40, 1960.
- SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R. - Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid: Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). *Arq. Neuropsiquiatr.*, **51**: 16-20, 1993.

- 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*). **J. Infect. Dis.**, **159**: 50-9, 1989.
- VAZ, A.J. - **Cysticercus longicollis: Caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquidiano no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana**. São Paulo, 1993. [Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- VAZ, A.J. - Neurocisticercose: aspectos biológicos, imunológicos e epidemiológicos. In: MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; SPINA-FRANÇA, A.; NÓBREGA, J.P.S., ed. - **Neuroinfecção 96**. São Paulo, Clínica Neurológica HC/FMUSP, 1996, p. 181-92.
- VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; CAMARGO, M.E.; CAMARGO, E.D.; FERREIRA, A.W. - Dot Elisa for the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in cerebrospinal fluid using a new solid phase (resin-treated polyester fabric) and *Cysticercus longicollis* antigens. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **38**: 391-6, 1996.
- VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.F.; LIVRAMENTO, J.A.; SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M.; FERREIRA, A.W. - Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **57**: 354-7, 1997.
- WEINBERG, M. - Recherche des anticorps spécifiques dans la distomatose et la cysticercose. **C. R. Soc. Biol (Paris)**, **66**: 219-21, 1909.
- WHITE, A.C.Jr. - Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. **Clin. Infect. Dis.**, **24**: 101-15, 1997.
- WHITE, A.C.Jr.; ROBINSON, P.; KUHN, R. - *Taenia solium* Cysticercosis: Host-parasite interactions and immune response. In: FREEDMAN, D.O., ed. - **Immunopathogenetic Aspects of Disease Induced by Helminth Parasites**. Chem. Immunol. Basel. Karger. 1997, vol 66, p 209-30.

- WILSON, M.; BRYAN, R.T.; FRIED, J.A.; WARE, D.A.; SCHANTZ, P.M.; PILCHER, J.B.; TSANG, V.C.W. - Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. **J. Infect. Dis.**, **164**: 1007-9, 1991.
- WITTIG, E.O. - Neurocisticercose: formas clínicas e aspectos anatomopatológicos In: MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; SPINA-FRANÇA, A.; NÓBREGA, J.P.S., ed. - **Neuroinfecção**, **96**. São Paulo, Clínica Neurológica HC/FMUSP, 1996, p. 193-204.
- YOU DEN, W.J. - Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, **3**: 32-5, 1950.
- ZINI, D.; FARRELL, V.J.R.; WADEE, A.A. - The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, **53**: 656-61, 1990.