

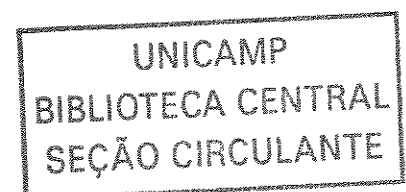
GISELE CRISTINA ARRUDA

**AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES ANTIGÊNICAS
OBTIDAS DE CISTICERCOS DE *TAENIA SOLIUM* E DE
TAENIA CRASSICEPS PARA O DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA NEUROCISTICERCOSE**

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi*

**Campinas
2002**

i



GISELE CRISTINA ARRUDA

**AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES ANTIGÊNICAS
OBTIDAS DE CISTICERCOS DE *TAENIA SOLIUM* E DE
TAENIA CRASSICEPS PARA O DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA NEUROCISTICERCOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi

**Campinas
2002**

UNIDADE	NU
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Ar69a
V	EX
TOMBO BC/	51854
PROC.	16-837-02
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/12/02
Nº CPD	

CM00177402-4

1810 276259

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

Ar69a

Arruda, Gisele Cristina

Avaliação de preparações antigênicas obtidas de cisticercos de *Taenia solium* e de *Taenia crassiceps* para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose / Gisele Cristina Arruda. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Cláudio Lúcio Rossi

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antígenos. 2. Sorologia. 3. Imunodiagnóstico. 4. Cisticercose.
I. Cláudio Lúcio Rossi. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Cláudio Lúcio Rossi

Membros:

1. Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi

2. Prof. Dr. José Antonio Livramento

3. Profa. Dra. Elizabeth Maria Aparecida Barasnevicius Quagliato

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

Data: 16/08/2002

20025 9567

A Deus, por permitir a realização deste trabalho.

Aos meus pais e ao Rogério, pelo amor,

incentivo e compreensão.

Agradecimentos

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

À Dra. Elizabeth Quagliato, pelo apoio e cooperação.

À Dra. Maria Adriana Maretti, pela cooperação.

À Dra. Maria Heloísa Blotta, pela amizade e apoio.

Aos funcionários da Seção de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela atenção e apoio técnico.

A Toyoko Takao, enfermeira responsável pela coleta de materiais do Laboratório de Patologia Clínica, pela cooperação.

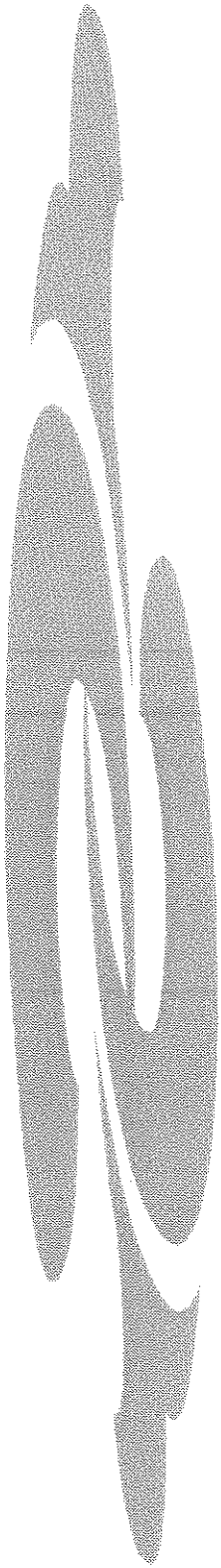
Aos amigos, Deise Renata Gonzalez Agnani, Letícia Chaves Ferreira Dias, Andrea Domênica Teodoro da Silva, Liliane de Cássia Matos, Lisandra Akemi Suzuki, Ronei Luciano Mamoni e Mariza Lins Gondo, que me incentivaram e apoiaram em muitos momentos do meu trabalho.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro à realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	<i>vii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. ARTIGO.....	18
Abstract.....	20
Introduction.....	21
Materials and Methods.....	23
Results.....	27
Discussion.....	29
References.....	35
Table 1.....	41
Figure 1.....	42
3. DISCUSSÃO.....	43
4. CONCLUSÕES.....	52
5. SUMMARY.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57



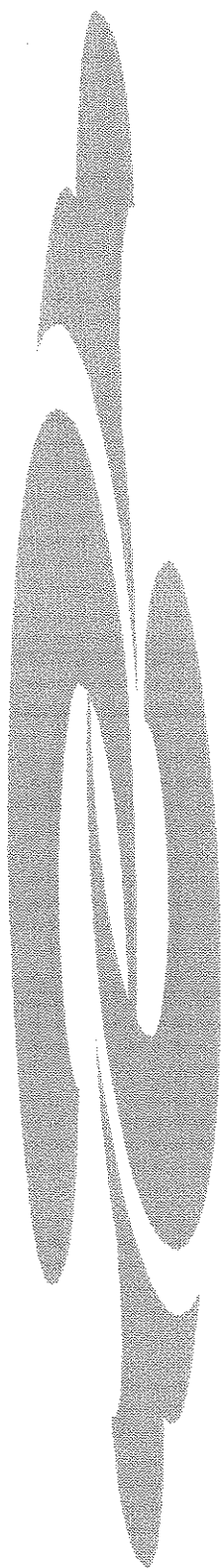
RESUMO

A neurocisticercose é uma importante causa de doença neurológica em muitos países em desenvolvimento. O diagnóstico clínico da neurocisticercose é dificultado pelo polimorfismo e pela não especificidade dos sintomas. Os procedimentos de neuroimagem, como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética nuclear (RMN), têm contribuído para um diagnóstico mais preciso e uma melhor compreensão dos processos patofisiológicos da neurocisticercose. Entretanto, o alto custo desses procedimentos tem limitado a sua utilização em países em desenvolvimento apresentando altas taxas de infecção. Nestas circunstâncias, a detecção de anticorpos específicos pode ser grande utilidade para o diagnóstico da neurocisticercose.

A detecção de anticorpos anti-cisticercos em amostras de LCR é considerada um critério importante para o diagnóstico da neurocisticercose. Entretanto, a pesquisa de anticorpos específicos em amostras de soros apresenta algumas vantagens: o soro é obtido de uma maneira menos invasiva do que o LCR, estudos soroepidemiológicos podem mapear áreas endêmicas e a pesquisa de anticorpos em amostras de soros pode ser útil em estudos de reatividade cruzada.

No presente estudo, a eficácia de sete preparações antigênicas, quatro de cisticercos de *T. solium* (extratos brutos total-TsoW, de membrana-TsoMe, de líquido vesicular-TsoLV e de escólex-TsoEsc) e três de cisticercos de *T. crassiceps* (extratos brutos total-TcraW, de membrana-TcraMe e de líquido vesicular-TcraLV), foi avaliada para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose usando uma técnica imunoenzimática (ELISA) quantitativa. Anticorpos IgG anti-cisticercos foram pesquisados em amostras de soros de 30 pacientes com neurocisticercose, 32 pacientes com outras infecções e 48 pessoas saudáveis. A técnica TsoW-ELISA apresentou 83% de sensibilidade e 89% de especificidade, enquanto que a sensibilidade e a especificidade da técnica TcraW-ELISA foram 67% e 86%, respectivamente. As especificidades das técnicas TsoMe-ELISA, TsoEsc-ELISA e TcraMe-ELISA foram, respectivamente, 91%, 89% e 78%, enquanto que a sensibilidade encontrada para os três ensaios foi 70%. O desempenho da técnica TsoLV-ELISA (80% de sensibilidade; 93% de especificidade) foi similar ao desempenho da técnica TsoW-ELISA, enquanto que o desempenho da técnica TcraLV-ELISA (77% de sensibilidade; 94% de especificidade) foi superior ao desempenho da técnica TcraW-ELISA. Nenhuma das preparações antigênicas utilizadas no presente estudo apresentou uma performance

excepcional. Entretanto, considerando os resultados obtidos com todas as preparações antigênicas, o líquido vesicular de cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* pode ser útil em reações imunológicas para a detecção de anticorpos específicos em soros de pacientes com neurocisticercose.



1. INTRODUÇÃO

A neurocisticercose, infecção causada pela localização do cisticerco da *Taenia solium* no sistema nervoso central (SNC), é reconhecida como uma das causas mais frequentes de doenças neurológicas, constituindo um importante problema de saúde pública em regiões onde as condições sanitárias são deficientes. Altas frequências da doença têm sido registradas em muitas regiões em desenvolvimento, incluindo o México, na América do Norte, e vários países da América Latina, Ásia e África (MAHAJAN, 1982; EARNEST *et al.*, 1987; AGAPEJEV, 1996; WHITE, 1997; ROMÁN *et al.*, 2000; SCIUTTO *et al.*, 2000). No Brasil, a neurocisticercose é encontrada com elevada frequência nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás e Ceará (SPINA-FRANÇA, LIVRAMENTO, MACHADO, 1993; AGAPEJEV, 1996; SOUZA *et al.*, 1998; TAKAYANAGUI & LEITE, 2001).

Estudos epidemiológicos indicam que quatro milhões de pessoas no mundo podem estar infectadas com o cisticerco da *T. solium* (SCHANTZ, 1989; WHITE, 1997). No Brasil, os estudos epidemiológicos desta doença restringem-se, na maioria das vezes, a serviços especializados de neurologia nas grandes cidades. Os trabalhos publicados indicam elevadas taxas de letalidade e morbidade (0,2% a 7,5%) e ressaltam o alto custo dos atendimentos aos pacientes (LANGE, 1940; SPINA-FRANÇA, 1956; CANELAS, 1962; GOBBI *et al.*, 1980; TAKAYANAGUI & JARDIM, 1983; MACHADO, PIALARISSI, VAZ, 1988; TAKAYANAGUI & LEITE, 2001).

O homem, responsável pela manutenção do ciclo parasitário, é o único hospedeiro definitivo da *T. solium*, eliminando diariamente proglotes cheias de ovos. Algumas vezes, as proglotes podem romper-se dentro do intestino e os ovos são eliminados com as fezes. O hospedeiro intermediário, normalmente o suíno, torna-se infectado ingerindo os ovos dispersos no meio. Estes, estimulados pela ação do ácido gástrico e fluídos intestinais, liberam os embriões hexacantos que penetram a mucosa intestinal, caem na corrente sanguínea, migrando, principalmente, para músculos e cérebro, onde transformam-se em cisticercos, num período de aproximadamente dois meses. O homem, ingerindo os ovos, pode, também, tornar-se o hospedeiro intermediário da *T. solium*. Na espécie humana, os cisticercos localizam-se principalmente no SNC, músculo esquelético, tecido subcutâneo e olhos (MILLER, HEINER, GOLDBERG, 1983; WHITE, 1997; SCIUTTO *et al.*, 2000).

Em um período variável de meses a anos, os cisticercos entram em degeneração, com conseqüente fibrose e calcificação. A evolução do cisticerco pode ser dividida em quatro estágios. No primeiro estágio, conhecido como vesicular, o cisticerco é formado por uma vesícula de membrana fina preenchida por um líquido translúcido, contendo no seu interior o escólex invaginado. O início da degeneração do parasita, natural ou precipitada pelos mecanismos imunológicos do hospedeiro, caracteriza o estágio coloidal. Nessa fase observa-se a degeneração da membrana do parasita e opacificação do líquido vesicular. No estágio seguinte, granular nodular, o parasita começa a diminuir de tamanho, sua parede torna-se mais espessa e seu conteúdo transforma-se em grânulos grosseiros, em consequência da deposição de sais de cálcio. Na fase final, estágio nodular calcificado, o cisticerco apresenta tamanho bastante reduzido em relação ao primeiro estágio, encontrando-se totalmente calcificado (PALACIOS, LUJAMBIO, JASSO, 1997; CARPIO, ESCOBAR, HAUSER, 1998; NOUJAIM *et al.*, 1999; SOTELO & DEL BRUTTO, 2000).

Os sintomas clínicos da neurocisticercose e eventuais seqüelas surgem, na maioria das vezes, meses ou até anos após o início da infecção. As manifestações clínicas da infecção são inespecíficas e dependem, entre outros fatores, do número, tamanho e localização dos parasitas no SNC, do estágio evolutivo dos cisticercos e seus processos reacionais sobre o hospedeiro e das respostas inflamatória e imune do hospedeiro aos parasitas (FLISSER, WOODHOUSE, LARRALDE, 1980; MILLER *et al.*, 1983; NASH & NEVA, 1984; SOTELO, GUERRERO, RUBIO, 1985; DEL BRUTTO & SOTELO, 1988; ZINI, FARRELL, WADEE, 1990; PITTELLA, 1997; WHITE, 1997; OSTROSKY-ZEICHNER & ESTAÑOL, 1999; SOTELO & DEL BRUTTO, 2000). As manifestações clínicas mais freqüentes são: crises epilépticas, síndrome de hipertensão intracraniana, meningite cisticercótica, distúrbios psíquicos e síndrome medular (SCHARF, 1988; DEL BRUTTO, 1997; CARPIO *et al.*, 1998; SCIUTTO *et al.*, 2000; SOTELO & DEL BRUTTO, 2000; TAKAYANAGUI & LEITE, 2001).

Entre os recursos utilizados para o diagnóstico da neurocisticercose destacam-se os procedimentos de neuroimagem e as técnicas imunológicas, realizadas com líquido cefalorraquidiano (LCR) e/ou soro. A demonstração histológica do parasita, utilizando biopsia, raramente é utilizada para a confirmação do diagnóstico da neurocisticercose, pois requer procedimento invasivo.

Diagnóstico por neuroimagem

O diagnóstico da neurocisticercose por neuroimagem tem sido realizado utilizando a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética nuclear (RMN). Dos muitos achados de neuroimagem obtidos com TC e RMN na neurocisticercose, somente a presença de lesões císticas bem definidas, nas quais é possível identificar o escólex do parasita são consideradas patognomônicas (CARPIO *et al.*, 1998; DEL BRUTTO *et al.*, 2001). Outros achados, como lesões únicas apresentando contraste anelar e calcificações, podem ser observados em outras doenças do SNC, tais como neoplasias, granulomas causados por fungos, tuberculomas e neurotoxoplasmose (DEL BRUTTO, 1999; GARG, KAR, KUMAR, 2000; SOTELLO & DEL BRUTTO, 2000; DEL BRUTTO *et al.*, 2001; GARG, 2002). Em termos comparativos, a RMN, além de fornecer uma avaliação mais precisa da reação inflamatória ao redor do cisticerco, permite uma melhor visualização das lesões localizadas nas cisternas da base, na fossa posterior, nos ventrículos, no canal raquiano e na medula espinhal. Entretanto, diferentemente da TC, a RMN apresenta baixa resolução para detectar pequenas calcificações parenquimatosas (PALACIOS *et al.*, 1997; WHITE, 1997; CARPIO *et al.*, 1998; SCIUTTO *et al.*, 2000). Este fato é uma limitação importante, pois muitos pacientes com neurocisticercose apresentam lesões calcificadas como a única evidência da doença (WHITE, 1997; CARPIO *et al.*, 1998). Mesmo com essas limitações, a TC e a RMN têm sido consideradas técnicas confiáveis para o diagnóstico da neurocisticercose, fornecendo também informações úteis com relação ao prognóstico e à evolução da infecção. O alto custo dos aparelhos utilizados nos procedimentos de neuroimagem, a difícil manutenção técnica e os elevados gastos operacionais têm dificultado a utilização da TC e RMN nos países em desenvolvimento, onde a incidência da neurocisticercose é bastante alta. Diante disto, vários pesquisadores têm salientado a importância da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de LCR e/ou soro.

Diagnóstico baseado na pesquisa de anticorpos

Na pesquisa de anticorpos anti-cisticercos destacam-se as reações de fixação de complemento (RFC), hemaglutinação indireta (HI), imunofluorescência indireta (IFI) e as imunoenzimáticas (ELISA e Imunoblot).

Reação de fixação de complemento (RFC)

Em 1909, Weinberg, na França, padronizou a RFC com uma preparação antigênica de *T. hidatigena* para a pesquisa de anticorpos específicos em soros de carneiros infectados. Em 1911, Moses, no Brasil, utilizou a RFC com antígenos de cisticercos de *T. solium* para a detecção de anticorpos em soro e LCR de pessoas com suspeita clínica de cisticercose. A RFC, em amostras de soros, além de baixa sensibilidade, apresenta um número significativo de reações cruzadas com outras infecções parasitárias. No LCR, na maioria dos estudos, a RFC tem apresentado sensibilidade variando de 70 a 90% e uma especificidade superior a 90% (REIS & BEI, 1958; REIS-FILHO, REIS, BEI, 1985; SPINA-FRANÇA *et al.*, 1993; GARCIA, ORDOÑEZ, SOTELO, 1995; SALINAS *et al.*, 1996).

Hemaglutinação indireta (HI)

Proctor, Powell, Elsdon-Dew, em 1966, padronizaram a reação de HI, utilizando um extrato bruto de cisticercos para o revestimento das hemácias. A HI apresenta maior sensibilidade do que a RFC. Em amostras de LCR e soros, na maioria dos trabalhos, têm-se obtido índices de sensibilidade e especificidade variando de 80 a 95% (LARRALDE *et al.*, 1986; NASCIMENTO, NOGUEIRA, TAVARES, 1987; PIALARISSI *et al.*, 1987; UEDA *et al.*, 1988; SALINAS *et al.*, 1996; FERREIRA *et al.*, 1997). Entre as vantagens da HI destacam-se a facilidade de execução, muito útil em levantamentos soropodemiológicos, e seu baixo custo. Entretanto, pode ocorrer uma variabilidade significativa de resultados quando diferentes lotes de hemácias revestidas com antígeno são utilizados.

Imunofluorescência indireta (IFI)

A primeira reação de IFI para cisticercose foi descrita por Biagi & Pinhã, em 1964. Na maioria dos estudos, a sensibilidade da reação de IFI tem variado de 79 a 97%, sendo a especificidade superior a 90% (BASSI *et al.*, 1979; LIVRAMENTO, 1981; PIALARISSI *et al.*, 1987; SIMONETTI & TEIXEIRA, 1987). Entre as vantagens da técnica de IFI, destacam-se a facilidade de execução e o baixo custo. Entre as desvantagens, destacam-se a dificuldade de obtenção de fragmentos do parasita com tamanhos similares para a fixação nas lâminas de imunofluorescência e a subjetividade da leitura.

Técnicas imunoenzimáticas (ELISA e Imunoblot)

A técnica ELISA permite o processamento simultâneo de um grande número de amostras, sendo, portanto, uma alternativa prática para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias, incluindo a cisticercose. A primeira técnica ELISA utilizada para o diagnóstico da cisticercose foi descrita por Arambulo *et al.*, em 1978. As reações ELISA têm sido muito utilizadas para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos, sendo encontrados em muitos trabalhos índices de sensibilidade e especificidade superiores a 90% (COSTA, 1986; LARRALDE *et al.*, 1986; PIALARASSI *et al.*, 1987; VAZ & FERREIRA, 1988; LARRALDE *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 1995).

Em 1989, Tsang, Brand, Boyer, descreveram uma técnica de Imunoblot para o imunodiagnóstico da neurocisticercose, utilizando uma preparação antigênica composta de glicoproteínas isoladas de um extrato bruto de cisticercos de *T. solium* por cromatografia de afinidade com Sepharose-Lentil-lectina. Vários autores têm salientado que essa é a técnica mais confiável para o imunodiagnóstico da neurocisticercose (DEL BRUTTO, 1997; DEL BRUTTO *et al.*, 2001). Entretanto, com relação à sensibilidade, o desempenho da técnica com amostras de soros é superior ao obtido com amostras de LCR (WHITE, 1997; DEL BRUTTO, 2002). No estudo inicial, a técnica de Imunoblot apresentou 98% de sensibilidade e 100% de especificidade, quando testada com uma bateria de 111 soros e 37 LCR de pacientes com neurocisticercose, 376 soros de pacientes com outras infecções e 54 soros de pessoas sadias (TSANG *et al.*, 1989). Posteriormente, Wilson *et al.* (1991), pesquisando a presença de anticorpos anti-cisticercos em amostras de soros e LCR de pacientes apresentando número variável de cistos, em diferentes estágios de evolução, detectados por meio de TC e/ou RMN, mostraram que a sensibilidade da técnica Imunoblot dependia do número e estágio evolutivo dos cisticercos no SNC. A técnica Imunoblot foi positiva em 94% dos pacientes apresentando dois ou mais cistos e em somente 28% dos pacientes apresentando um único cisto. A técnica foi também avaliada em amostras de soros e LCR de 35 pacientes apresentando somente cistos calcificados. Em cinco pacientes apresentando somente um cisto calcificado, a técnica foi positiva em duas amostras de soros e uma amostra de LCR. Em 30 pacientes apresentando dois ou mais cistos, a técnica foi positiva em 27 amostras de soros e 24 amostras de LCR. Convém salientar que o alto custo e a difícil execução da técnica Imunoblot têm dificultado a sua utilização em muitos

países em desenvolvimento (PLANCARTE, FEXAS, FLISSER, 1994; ITO *et al.*, 1998; GARG, 2002).

No final da década de 80, começou haver dificuldade de obtenção de porcos infectados com cisticercos da *T. solium*. A possibilidade de escolha de um modelo animal, de fácil manutenção em laboratório, como fonte alternativa de parasitas para a obtenção de antígenos para o imunodiagnóstico da neurocisticercose, surge a partir de observações da ocorrência de antígenos comuns entre as *Taenias*, entre elas a *T. crassiceps*, um parasita comum de raposas, cuja forma larvária pode ser encontrada em pequenos roedores (FREEMAN, 1962). A partir de 1990, surgiram várias publicações ressaltando a utilidade de preparações antigênicas de cisticercos da *T. crassiceps* para o diagnóstico de neurocisticercose (LARRALDE *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 1995; VAZ *et al.*, 1996; DEL BRUTTO, 1997; SOTELO & DEL BRUTTO, 2000). Entre as vantagens, os autores salientam o alto índice de reações cruzadas observadas entre antígenos de cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps*, a raridade da infecção por *T. crassiceps* na espécie humana e a possibilidade de obtenção de grandes quantidades de cisticercos da *T. crassiceps*, utilizando o modelo laboratorial de infecção adaptada em camundongo. Por causa da rápida reprodução, em poucos meses milhares de cistos são obtidos na cavidade peritoneal de um único camundongo previamente infectado (KUNZ *et al.*, 1989; GARCIA *et al.*, 1995).

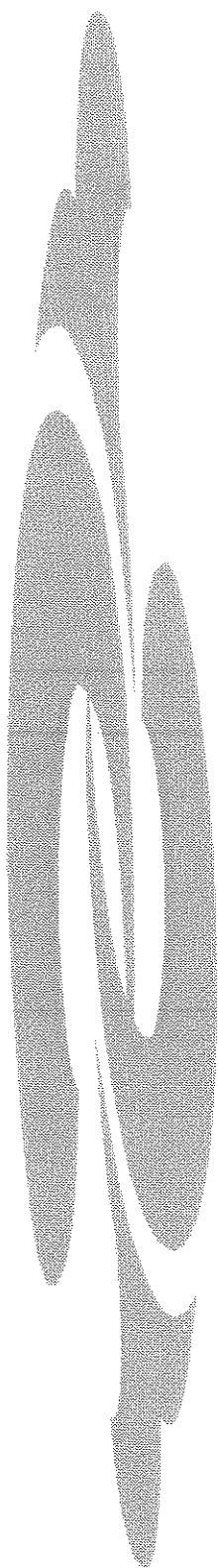
Um grande número de preparações antigênicas de cisticercos tem sido utilizado em técnicas imunoenzimáticas para o imunodiagnóstico da neurocisticercose, incluindo extratos brutos do parasita (total) e de seus componentes: membrana, escólex e líquido vesicular (ARAMBULO *et al.*, 1978; CORONA *et al.*, 1986; TSANG *et al.*, 1989; LARRALDE *et al.*, 1990; ITO *et al.*, 1998; BUENO *et al.*, 2000; SOTELO & DEL BRUTTO, 2000).

A maioria dos testes ELISA 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 positivos que

devem ser utilizados em todas as placas de reação, devendo a reatividade da amostra sendo testada ser expressa em relação aos mesmos (HANCOCK & TSANG, 1986; MADDISON, 1987).

A detecção de anticorpos anti-cisticercos em amostras de LCR tem sido considerada um critério importante para o diagnóstico da neurocisticercose (DEL BRUTTO & SOTELO, 1988; DEL BRUTTO *et al.*, 2001; KATTI, 2002). Entretanto, a pesquisa de anticorpos específicos em amostras de soros apresenta algumas vantagens: o soro é obtido de uma maneira menos invasiva do que o LCR, estudos soroepidemiológicos podem mapear áreas endêmicas e a pesquisa de anticorpos em amostras de soros pode ser útil em estudos de reatividade cruzada.

Considerando o elevado número de casos de neurocisticercose registrado nos últimos anos e a complexidade do diagnóstico clínico, este estudo foi motivado pela necessidade de aumentar a eficiência do imunodiagnóstico da neurocisticercose. Até o presente momento, existe um número reduzido de trabalhos avaliando simultaneamente preparações antigênicas de cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* para o imunodiagnóstico da neurocisticercose. O presente trabalho tem como objetivo comparar a eficiência de preparações antigênicas obtidas de cisticercos de *T. solium* (extratos brutos total, de membrana, de líquido vesicular e de escólex) e de *T. crassiceps* (extratos brutos total, de membrana e de líquido vesicular) para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose, utilizando uma técnica ELISA quantitativa.



2. ARTIGO

Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis

Running title: Serodiagnosis of neurocysticercosis

Gisele C. Arruda^a, Andrea D.T. da Silva^a, Elizabeth M.A.B. Quagliato^b,
Maria A. Maretti^b, Cláudio L. Rossi^{a●}

^a Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6111, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil.

^b Department of Neurology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP).

●Corresponding author. Cláudio Lúcio Rossi

Tel.: 55-19-3289-3273; Fax 55-19-3788-9434

E-mail address: clr@fcm.unicamp.br

Abstract

The usefulness of seven cysticercal antigen extracts, four from *T. solium* cysticerci (whole parasite-TsoW, membrane-TsoMe, vesicular fluid-TsoVF and scolex-TsoSc) and three from *T. crassiceps* cysticerci (whole parasite-TcraW, membrane-TcraMe and vesicular fluid-TcraVF), for serodiagnosis of neurocysticercosis was evaluated using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Cysticercus*-specific IgG were screened in serum samples from 30 patients with neurocysticercosis, 32 patients with other infections and 48 healthy persons. The TsoW-ELISA showed 83% sensitivity and 89% specificity, whereas the sensitivity and specificity of the TcraW-ELISA were 67% and 86%, respectively. The specificities for the TsoMe-ELISA, TsoSc-ELISA and TcraMe-ELISA were, respectively, 91%, 89% and 78%, whereas the sensitivity for all three assays was 70%. The performance of the TsoVF-ELISA (80% sensitivity; 93% specificity) was similar to that of the TsoW-ELISA, whereas the performance of the TcraVF-ELISA (77% sensitivity; 94% specificity) was superior to that of the TcraW-ELISA. None of the antigen preparations from *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci used in this study showed outstanding performance for the serodiagnosis of neurocysticercosis. However, considering the results obtained with the seven antigen preparations, vesicular fluid from *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci may be useful for detecting specific antibodies in sera from patients with neurocysticercosis.

1. Introduction

Neurocysticercosis is an important health problem in many Asian, African and Latin American countries with inadequate sanitary conditions, as well as in some industrialized nations with a high immigrant population from disease-endemic areas (Agapejev, 1996; Earnest et al., 1987; Román et al., 2000; Sciutto et al., 2000; White, 1997).

The clinical signs and symptoms of neurocysticercosis are variable and nonspecific, and depend upon the cyst load, the topographic localization of cysts, the parasite's biological state and the host's immune response (Del Brutto & Sotelo, 1988; Pittella, 1997; Sciutto et al., 2000; Sotelo et al., 1985; White, 1997; Zini et al., 1990). Thus, a definitive diagnosis of neurocysticercosis should always be considered in an epidemiological context and confirmed by diagnostic criteria, including a histological demonstration of the parasite in a biopsy of the involved tissue, evidence of cystic lesions showing the scolex or other lesions suggestive of cysticercosis in neuroimaging studies, and positive immunological tests in cerebrospinal fluid (CSF) and/or serum samples (Del Brutto et al., 2001; White, 1997). Parasitological confirmation of *T. solium* cysts by biopsy of a brain lesion is rarely indicated or possible to perform. Neuroimaging techniques such as computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) have been recognized as the “gold standard” for neurocysticercosis (Sciutto et al., 2000). However, in many cases, these techniques may not provide a definitive diagnosis of neurocysticercosis because the complex pathological processes of this disease in the CNS often mimic other infectious or non-infectious diseases (Couldwell et al., 1995; Del Brutto, 1999; Garg et al., 2000; Palacios et al., 1997). Moreover, because of their high cost, these sophisticated procedures are rarely available in many areas of endemicity in developing countries.

Several tests have been used for the immunodiagnosis of neurocysticercosis, including complement fixation (CF), indirect immunofluorescence (IIF), indirect hemagglutination (IH), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay (Miller et al., 1983; Píalarissi et al., 1987; Spina-França et al., 1993; Takayanagui & Leite, 2001; Tsang et al., 1989). A positive immunological test for *T. solium* cysticercal antigens in CSF samples has been considered an important criterion for the diagnosis of neurocysticercosis (Del Brutto & Sotelo, 1988; Del Brutto et al., 2001). However, the use of serum samples for the immunodiagnosis of

neurocysticercosis has some advantages: serum can be obtained in a less invasive manner than CSF, serum epidemiological studies can map areas of endemicity, and serum analysis can be very useful for cross-reactivity studies.

Currently, the most reliable immunological test for the immunodiagnosis of neurocysticercosis is an EITB assay done with serum samples using glycoprotein (GP) antigens prepared by lectin-affinity chromatography from an extract of intact *T. solium* cysts. However, EITB is an expensive and complex technique for use in routine laboratories or in epidemiological studies, especially in developing countries where neurocysticercosis is endemic. With the exception to EITB, the performance of ELISA is superior to other techniques used for the immunodiagnosis of neurocysticercosis. However, the characteristics of the ELISAs used to detect specific antibodies in neurocysticercosis make it difficult to compare results obtained by different laboratories.

In many countries, pigs naturally infected with *T. solium* larvae are difficult to obtain, a fact that has stimulated the search for alternative sources of antigens for the immunodiagnosis of neurocysticercosis. The larval form of the related species *T. crassiceps* strain ORF, which reproduces asexually by intraperitoneal passage through BALB/c mice, has been used as a source of antigens for the detection of anti-cysticercus antibodies in immunological tests (Bueno et al., 2001; Garcia et al., 1995; Larralde et al., 1990; Sotelo & Del Brutto, 2000; Vaz et al., 1996).

So far, there is no agreement on the best antigen preparation to use in ELISA for neurocysticercosis. Some authors have used crude extracts of whole *T. solium* or *T. crassiceps* cysticerci, whereas others have used crude extracts from particular components of the parasites (scolex, membrane, vesicular fluid) or even purified antigens. In this paper, the usefulness of seven cysticercal antigen extracts, four from *T. solium* cysticerci (whole parasite-TsoW, membrane-TsoMe, vesicular fluid-TsoVF and scolex-TsoSc) and three from *T. crassiceps* cysticerci (whole parasite-TcraW, membrane-TcraMe and vesicular fluid-TcraVF), for the serodiagnosis of neurocysticercosis was evaluated using an ELISA procedure.

2. Materials and methods

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

2.1. *Cysticercal antigens*

T. solium cysticerci were obtained from a heavily infected, freshly slaughtered pig. Larval *T. crassiceps* (strain ORF) were kindly supplied by Dr. Adelaide Vaz (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) and the parasites were maintained by the intraperitoneal inoculation of cysts into female Balb/c mice 8 to 12 weeks old. After 90 days, the cysticerci were harvested from the peritoneal cavity by washing with sterile 0.15 M phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS). Seven cysticercal antigens TsoW, TsoMe, TsoVF, TsoSc, TcraW, TcraMe and TcraVF were prepared with *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci.

Intact *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci were washed extensively with sterile PBS and aliquotted in plastic tubes for freezing (whole cysticerci) or in Petri dishes for the collection of vesicular fluid, membranes and scoleces. The parasites in Petri dishes were ruptured individually with the aid of two needles, and the vesicular fluid released was collected with a Pasteur pipette and transferred to centrifuge tubes. The fluid was then centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 4°C and the supernatants were sonicated for 1 min (30s sonication/30s pause) in an ice-water bath using a Branson Sonicator (model SX 30) at a power setting of three with a 20% pulse duty cycle. After sonication, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and leupeptin were added to the TsoVF and TcraVF to give final concentrations of 5 mM and 0.0025 mM, respectively, and the preparations then stored in aliquots at -80°C. After removing the vesicular fluid from *T. solium* cysticerci, the scoleces and membranes were separated by dissecting the parasites with a scalpel. The scoleces and membranes of *T. solium* cysticerci and the membranes of *T. crassiceps* cysticerci were washed extensively with PBS and stored at -80°C until used.

The same procedure was used for the preparation of TsoW, TsoMe, TsoSc, TcraW and TcraMe. Frozen cysts, membranes and scoleces were quickly thawed and resuspended in approximately three volumes of PBS containing 5 mM PMSF and 0.0025 mM leupeptin and the materials then homogenized in an ice-water bath using a Polytron® homogeneizer (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, USA) equipped with a PT-20 ST probe (three 30s

pulses at speed 3 with 30s intervals between pulses). The homogenates were then sonicated for 3 min (1min sonication/1min pause) in an ice-water bath using a Branson Sonicator at a power setting of three with a 20% pulse duty cycle. Protease inhibitors (PMSF and leupeptin) were subsequently added to the sonicated material at the concentrations described above and the suspensions then stirred gently for 2 h at 4°C. Centrifugation of the homogenates at 15,000 x g for 60 min at 4°C resulted in a white floating layer followed by a clear supernatant and finally the pellet. After removing the floating layer with a Pasteur pipette, the supernatants were collected and filtered through 0.45 µm filters (Millex filters, Millipore Corporation, Bedford, USA). The protein concentration of the antigen extracts was determined by the method of Bradford (1976), after which the preparations were aliquotted and stored at – 80°C until used.

2.2. Human serum pools

A human serum pool positive for cysticercosis (CYSP) was prepared by mixing equal parts of sera from seven patients with parasitologically confirmed cysticercosis who had a positive ELISA for *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci antigens. The CYSP was initially used to determine the optimal reagent concentrations in ELISA and subsequently as a standard in each ELISA plate. A normal human serum (NHS) pool served as a negative control in the ELISA. The NHS pool was prepared by mixing equal parts of sera from 10 healthy subjects who had never lived in or travelled to endemic areas and had no clinical or serological evidence of cysticercosis.

2.3. Determination of optimal reagent concentrations

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

2.4. Linearity of substrate conversion

The linearity of substrate conversion was determined using the CYSP diluted 1:100 and 1:500. The rate of substrate conversion was assessed after 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 and 30 min of incubation at room temperature.

2.5. ELISA

The ELISA was done as previously described (Silva et al., 2000), with few modifications. Briefly, cysticercal antigens, diluted to 3 µg protein/ml in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.5, were used to sensitize wells of U-bottomed ELISA plates (Corning, NY, 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% bovine serum albumin (BSA) in PBS were added to the wells. After incubation for 30 min at room temperature, the wells were washed once with PBS-Tween, and 100 µl of each serum sample diluted 1:100 in PBS-Tween containing 1% BSA 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 conjugate diluted 1:700 in PBS-Tween were added to the wells and the plate was incubated for 1 h at room temperature followed by washing with PBS-Tween, as previously described. Immediately after washing, 100 µl of the substrate system (o-phenylenediamine-OPD/H₂O₂), were added to the wells. Five minutes after the addition of substrate, 50 µl of 4 N H₂SO₄ were added to each well to stop the reaction and the resulting absorbances were then measured at 492 nm using an ELISA reader (Spectra SLT, SLT Instruments, Austria). Each serum sample and the positive reference pool (CYSP) were tested in triplicate with the seven antigen preparations in the same plate and the mean absorbances determined. The final optical density (OD) for each serum sample and for CYSP was determined by subtracting the mean OD of the three antigen controls in the corresponding plate. The results were expressed as an antibody index (AI) by dividing the final OD of the serum sample by the final OD of the CYSP. The cut-off value for the ELISA was determined using the highest J index (Youden, 1950). The J index was calculated for cut-off values ranging from 0.10 to 0.70 AI at 0.5 intervals. The formula for this index is: $J = (a/b) + (c/d) - 1$, where a is the number of subjects infected with a positive

serology, b is the total number in the infected group, c is the number of uninfected with negative serology, and d is the total number in the uninfected group.

2.6. Serum samples

A collection of 110 serum samples was screened. The samples were grouped as follows: sera from patients with neurocysticercosis (n=30), syphilis (n=6), toxoplasmosis (n=6), *Leishmania donovani* infection (n=3), *Schistosoma mansoni* infection (n=4), *Schistosoma haematobium* infection (n=2), cytomegalovirus infection (n=2), infectious mononucleosis (n=3), hepatitis A (n=2) and B (n=4) virus infection, and normal serum samples (n=48). All of the patients with neurocysticercosis were attended at the University Hospital of the State University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil) and had CT and/or MRI scans compatible with neurocysticercosis. The serum samples from patients with other infections were obtained from individuals who never lived in or travelled to areas endemic for cysticercosis. The normal sera were obtained from healthy persons with no clinical and epidemiological evidence of infection by *T. solium*.

3. Results

On the basis of antigen titration for the seven cysticercal antigens, an excess antigen concentration was achieved at concentrations of 1.5 to 2 µg protein/ml. All assays requiring an antigen excess were done with 3 µg protein/ml. Conjugate excess occurred at dilutions lower than 1:1000. All assays requiring a conjugate excess were done using a conjugate dilution of 1:700. Linearity studies showed that the rates of substrate conversion were linear for at least 10 min for CYSP diluted 1:100 and 1:500. Additional experiments were done with the NHS pool to select the best substrate time. A 5 min incubation was chosen because this provided the best color contrast between positive and negative reactions.

Thirty serum samples from patients with neurocysticercosis, 32 serum samples from patients with other infections and 48 serum samples from healthy persons were tested by ELISA using seven cysticercal antigen extracts, four from *T. solium* cysticerci (TsoW, TsoMe, TsoVF and TsoSc) and three from *T. crassiceps* cysticerci (TcraW, TcraMe and TcraVF). The ELISA results for all of the serum samples tested are shown in Figure 1. The cut-off values for the assays, determined by the highest J index, ranged from 0.15 to 0.65 (TsoW=0.40; TsoMe=0.50; TsoVF=0.20; TsoSc=0.60; TcraW=0.50; TcraMe=0.55; TcraVF=0.50). Table 1 summarizes the performances of the assays with different cysticercal antigens. The ELISA done with a whole extract from *T. solium* cysticerci (TsoW-ELISA) showed 83% sensitivity and 89% specificity, whereas the sensitivity and specificity of the assay done with a whole extract from *T. crassiceps* cysticerci (TcraW-ELISA) were 67% and 86%, respectively. In the 30 serum samples from patients with neurocysticercosis, 20 were positive by TsoW-ELISA and TcraW-ELISA and five were positive only by TsoW-ELISA. Seven serum samples from patients with other infections (one syphilis, one *S. mansoni* infection, two hepatitis B virus infections and three toxoplasmosis) cross-reacted with the TsoW and TcraW antigen preparations. In addition, one viral hepatitis A serum sample and one serum sample from a healthy person were cross-reactive with TsoW, whereas two serum samples from patients with other infections (one cytomegalovirus and one infectious mononucleosis) and one serum sample from a healthy person cross-reacted with TcraW. The specificities for the TsoMe-ELISA, TsoSc-ELISA and TcraMe-ELISA were, respectively, 91%, 89% and 78%, whereas the sensitivity for all three assays was 70%. The TsoVF-ELISA showed 80% sensitivity and 93%

specificity, whereas the sensitivity and specificity of the TcraVF were 77% and 94%, respectively. Four serum samples from patients with other infections (syphilis, toxoplasmosis, infectious mononucleosis, hepatitis B virus infection) were cross-reactive with the TsoVF and TcraVF antigen preparations. In addition, one serum sample from a *S. haematobium* infection and one serum sample from a cytomegalovirus infection cross-reacted with TsoVF, whereas one serum sample from a healthy person cross-reacted with TcraVF.

4. Discussion

Neurocysticercosis is an important cause of neurological disease in many developing countries. The clinical diagnosis of neurocysticercosis is impaired by the polymorphism and nonspecificity of the symptoms. Neuroimaging techniques have contributed to a more accurate diagnosis and a better understanding of the pathophysiology of neurocysticercosis (Del Brutto, 1999; Noujaim et al., 1999; 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. In these circumstances, the detection of cysticercus-specific antibodies is of considerable value for the diagnosis of neurocysticercosis.

Few reports have simultaneously compared the usefulness of antigen preparations from whole *T. solium* and/or *T. crassisepe* cysticerci, membranes, scoleces and vesicular fluid for the serodiagnosis of neurocysticercosis. Nascimento and Mayrink (1984) evaluated the use of antigens from *T. solium* cysts in the immunodiagnosis of neurocysticercosis by an IH test. The crude extract prepared from scoleces and a purified fraction obtained from this extract by ion exchange chromatography (SPA) were more specific than whole cyst, vesicular fluid and membrane antigens. Using serum samples from patients with neurocysticercosis, the sensitivities of the IH tests done with the crude scolex extract and SPA were 80% and 84%, respectively. Nascimento et al. (1987) showed that SPA improved the serological distinction between infected and uninfected patients in IH and ELISA tests. In the IH, serum antibodies were detected in 73% of the cases when a crude antigen extract (CAE) from whole *T. solium* cysticerci was used and 86% using SPA. In ELISA, 63% of patients were positive when CAE was used and in 91% using SPA. Costa (1986) studied the usefulness of five antigens from *T. solium* cysticerci for the serodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA and a serum battery with 182 serum samples (35 from patients with neurocysticercosis, 57 from patients with other infections and 90 from supposedly healthy blood bank donors). The ELISA sensitivity was 88.6% for vesicular fluid, membrane and scolex antigens, 85.7% for a saline whole extract and 62.8% for an alkaline whole extract, whereas the specificity was 100% for all five antigens studied. Larralde et al. (1986), using IH and ELISA with vesicular fluid from *T. solium* cysticerci as antigen, detected specific antibodies in samples from infected persons with

95% sensitivity in a nonendemic area, and 80-90% in an endemic area. Baily et al. (1988), using an ELISA with antigens prepared from vesicular fluid, scolex and the cyst wall of *T. solium* cysticerci, showed that the sera from patients with proven neurocysticercosis were most reactive using vesicular fluid and least reactive using cyst wall antigens. Morakote et al. (1992) evaluated an ELISA with an extract from scoleces and membranes (ELISA-CS) and vesicular fluid (ELISA-CF) from *T. solium* cysticerci for the serodiagnosis of neurocysticercosis. Using 32 serum samples from patients with neurocysticercosis and 30 serum samples from subjects with other parasitosis, the ELISA-CS showed 78.1% sensitivity and 93.3% specificity, whereas the sensitivity and specificity of the ELISA-CF were 81.3% and 100%, respectively. Dekumyoy et al. (2000), using an ELISA done with vesicular fluid from *T. solium* cysticerci, found a sensitivity of 90.5% for 21 sera from patients with neurocysticercosis and 89.3% specificity for 234 sera from subjects with other parasitic infections.

The increasing difficulty in obtaining cysticerci from parasitized pigs and the extensive sharing of antigens between *T. solium* and *T. crassiceps*, have led several groups to evaluate the possibility of substituting antigens from *T. solium* cysts with those from the laboratory-adapted murine cestode *T. crassiceps* strain ORF for the immunodiagnosis of neurocysticercosis. Kunz et al. (1989) evaluated the performance of ELISA with vesicular fluid from *T. solium* (Tso-ELISA) and *T. crassiceps* (Tcra-ELISA) and showed that both assays were sensitive enough to detect antibodies in all cysticercosis sera tested, although a higher-intensity reading was observed with the Tso-ELISA. Larralde et al. (1990) showed that membrane and vesicular fluid antigens from *T. crassiceps* cysts performed as equally well as their analogs in *T. solium* cysts in an ELISA used to detect cysticercal antibodies in CSF samples from patients with neurocysticercosis. This publication stimulated several other reports dealing with the evaluation of the usefulness of vesicular fluid from *T. crassiceps* cysticerci in immunoenzymatic reactions (ELISA and immunoblotting) for detecting anticysticercal antibodies in CSF and/or serum samples. Bueno et al. (2000) screened serum samples from patients with neurocysticercosis, individuals with other parasitoses, and presumably healthy persons by ELISA with *T. crassiceps* vesicular fluid antigen (Tcra-ELISA) and *T. solium* total saline antigen (Tso-ELISA). The Tcra-ELISA and Tso-ELISA showed 91.2% and 70.6% sensitivities, respectively, with 80% specificity

for both assays. Bueno et al. (2001) compared the efficiency of vesicular fluid from *T. crassiceps* cysticerci (Tcra-ELISA) and an antigen preparation from the scolex and membrane of *T. solium* cysticerci (Tso-ELISA) in an ELISA for the serodiagnosis of neurocysticercosis. The sensitivity of both assays was 100%, whereas the specificities of Tcra-ELISA and Tso-ELISA were 96.7% and 90%, respectively.

In the present study, the usefulness of seven antigen preparations, four from *T. solium* cysticerci (whole parasite extract-TsoW, membrane-TsoMe, vesicular fluid-TsoVF and scolex-TsoSc), and three from *T. crassiceps* cysticerci (whole parasite extract-TcraW, membrane-TcraMe and vesicular fluid-TcraVF), were evaluated using ELISA. Four serum samples were negative with all of the seven antigens. All of these patients had been followed up for 2 to 5 years, with neuroimaging studies and ELISA results for CSF samples compatible with neurocysticercosis. Several studies have shown that immunoenzymatic tests for neurocysticercosis are less likely to react in patients with calcified cysts than in those with noncalcified parasites (Baily et al., 1988; Chang et al., 1988; Espinoza et al., 1986; Pammenter & Rossouw, 1987; Wilson et al., 1991). Of the four serum samples that did not react with any antigens, one was from a patient with calcified cysts. Considering the ELISA results with the whole cysticercal extracts, the TsoW-ELISA showed a superior performance, mainly in terms of sensitivity. Five serum samples from patients with neurocysticercosis were positive by TsoW-ELISA and negative by TcraW-ELISA. Two of these five serum samples were from patients presenting calcified cysts. The ELISA done with membrane extracts from cysts of *T. solium* (TsoMe-ELISA) and *T. crassiceps* (TcraMe-ELISA) and the scolex extract from *T. solium* cysts (TsoSc-ELISA) showed a low performance. The specificities for the TsoMe-ELISA, TsoSc-ELISA and TcraMe-ELISA were, respectively, 91%, 89% and 78%, whereas the sensitivity for all three assays was 70%. The performance of the TsoVF-ELISA (80% sensitivity; 93% specificity) was similar to that of the TsoW-ELISA (83% sensitivity; 89% specificity), whereas the performance of the TcraVF-ELISA (77% sensitivity; 94% specificity) was superior to that of the TcraW-ELISA (67% sensitivity; 86% specificity).

The greatest difficulty in serological tests for neurocysticercosis has been the cross-reactivity between cysticercal antigens and serum antibodies from patients with other infections. When whole extracts from *T. solium* cysticerci are used in ELISA reactions, a

significant number of cross-reactions may occur with serum from other infections such as echinococcosis, schistosomiasis, fascioliasis, angiostrongyliasis, ascariasis, filariasis, toxoplasmosis and *Hymenolepis nana* infection (Arambulo et al., 1978; Dekumyoy et al., 1998; Diaz et al., 1992; Diwan et al., 1982; Ng & Ko, 1994; Silva et al., 2000).

In the present study, cross-reactions with TsoW and TcraW antigens were observed with serum samples from patients with syphilis, *S. mansoni* infection, viral hepatitis B infection and toxoplasmosis. Cross-reactions with only TsoW were observed in one patient having viral hepatitis A, whereas cross-reactions with only TcraW were observed in one patient with a cytomegalovirus infection and one patient with infectious mononucleosis. In addition, two serum samples from healthy persons reacted with the whole extracts, one with TsoW and the other with TcraW. These persons had no evidence of cysticercosis and the cause of positivity is still uncertain.

Our results confirmed that vesicular fluid from *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci may be useful in immunological reactions for the serodiagnosis of neurocysticercosis. However, cross-reactions with serum samples from patients with syphilis, toxoplasmosis, infectious mononucleosis and hepatitis B virus infections were detected with TsoVF and TcraVF. Cross-reactions with only TsoVF were observed with one serum sample from a cytomegalovirus infection and one serum sample from a *S. haematobium* infection. One serum sample from a healthy person was also reactive with TcraVF. This person had no evidence of cysticercosis and the cause of positivity is still uncertain. Other studies have shown that components in the vesicular fluid from *T. solium* cysticerci are recognized by serum samples from patients with other infections, including echinococcosis, onchocercosis, gnathostomiasis, strongyloidiasis, angiostrongyliasis, ascariasis and toxocariasis (Dekumyoy et al., 2000; Morakote et al., 1992; Ng & Ko, 1994; Zini et al., 1990).

Variations in the performances of immunological tests for the diagnosis of neurocysticercosis are expected and are probably related to factors such as the criteria used for the selection of patients with neurocysticercosis and other infections as well as healthy persons, the heterogeneity of the patients with neurocysticercosis, the time of blood or CSF sampling relative to the onset of infection, the number, localization and stage of parasite development, the immune status of the patients at the time of blood or CSF collections, the

intrinsic properties of the techniques used for antibody detection, and the methods of expressing the results and calculating the cut-off value.

In this study, the J index was used for defining the cut-off value. A common method for calculating the cut-off level is to use the mean of the results obtained with healthy controls plus two standard deviations. Using this approach, different sensitivity values were observed only with the TsoMe-ELISA (73%) and TcraMe-ELISA (63%). With the exception of the TcraMe-ELISA which showed 84% specificity, all the other assays showed specificity values (80% to 86%) lower than those obtained with the J index cut-off value.

The incorporation of a positive serum standard for cysticercosis (CYSP), which was tested with all seven antigen preparations in every plate, and the expression of results as an antibody index ($AI = \text{serum sample OD} / \text{CYSP OD}$) greatly reduced the variability in the reactivity of the ELISA. The production and availability of a positive standard for cysticercosis by an international institution and its inclusion in immunological reactions such as ELISA could allow a more reliable comparison of the results obtained by different laboratories.

In conclusion, none of the antigen preparations from *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci used in this study showed outstanding performance for the serodiagnosis of neurocysticercosis. However, considering the results obtained with the seven antigen preparations, vesicular fluid from *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci may be useful for detecting specific antibodies in sera from patients with neurocysticercosis.

Acknowledgments

Gisele Cristina Arruda was supported by a fellowship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- Agapejev, S. (1996) Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 38, 207-216.
- Arambulo III, P.V., Walls, K.W., Bullock, S. & Kagan, I.G. (1978) Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). *Acta Tropica* 35, 63-67.
- Baily, G.G., Mason, P.R., Trijssenar, F.E.J. & Lyons, N.F. (1988) Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA tests using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 295-299.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bueno, E.C., Snege, M., Vaz, A.J. & Leser, P.G. (2001) Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 1140-1144.
- Bueno, E.C., Vaz, A.J., Machado, L.R., Livramento, J.A. & Miele, S.R. (2000) Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 146-151.
- Chang, K.H., Kim, W.S., Cho, S.Y., Han, M.C. & Kim, C.W. (1988) Comparative evaluation of brain CT and ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *American Journal of Neuroradiology* 9, 125-130.
- Costa, J.M. (1986) Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose: estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e de líquido cefalorraqueano. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 44, 15-31.

- Couldwell, W.T., Chandrasoma, P., Apuzzo, M.L. & Zee, C.S. (1995) Third ventricular cysticercal cyst mimicking a colloid cyst: case report. *Neurosurgery* 37, 1200-1203.
- Dekumyoy, P., Anantaphruti, M.T., Nuamtanong, S., Watthanakulpanich, D., Waikagul, J. & Danis, M. (2000) Neurocysticercosis: utilizing the cystic fluid antigen from *Taenia solium* metacestodes for diagnosis by IgG-ELISA. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 31, 21-25.
- Dekumyoy, P., Vanijanonta, S., Waikagul, J., Sa-nguankiat, S. & Danis, M. (1998) Use of delipidized antigens of *Taenia solium* metacestodes in IgG-ELISA for detection of neurocysticercosis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 29, 572-578.
- Del Bruto, O.H. (1999) Neurocysticercosis. *Revista de Neurologia* 29, 456-466.
- Del Brutto, O.H., Rajshekhar, V., White Jr, A.C., Tsang, V.C.W., Nash, T.E., Takayanagui, O.M., Schantz, P.M., Evans, C.A.W., Flisser, A., Correa, D., Botero, D., Allan, J.C., Sarti, E., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H. & Garcia, H.H. (2001) Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology* 57, 177-183.
- Del Brutto, O.H. & Sotelo, J. (1988) Neurocysticercosis: an update. *Reviews of Infectious Diseases* 10, 1075-1087.
- 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., and the Cysticercosis Working Group in Peru (C.W.G.) (1992) 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46, 610-615.
- Diwan, A.R., Coker-Vann, M., Brown, P., Subianto, D.B., Yolken, R., Desowitz, R., Escobar, A., Gibbs Jr, C.J. & Gajdusek, D.C. (1982) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31, 364-369.

- Earnest, M.P., Reller, L.B., Filley, C.M. & Grek, A.J. (1987) Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review. *Reviews of Infectious Diseases* 9, 961-979.
- Espinoza, B., Ruiz-Palacios, G., Tovar, A., Sandoval, M.A., 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. *Journal of Clinical Microbiology* 24, 536-541.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 3324-3325.
- Garg, R.K., Kar, A.M. & Kumar, T. (2000) Neurocysticercosis like presentation in a case of CNS tuberculosis. *Neurology India* 48, 260-262.
- Kunz, J., Kalinna, B., Watschke, V. & Geyer, E. (1989) *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 271, 510-520.
- Larralde, C., Laclette, J.P., Owen, C.S., Madrazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Diaz, M.L., Govezensky, T., Montoya, R.M. & Goodsaid, F. (1986) Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35, 965-973.
- Larralde, C., Sotelo, J., Montoya, R.M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Diaz, M.L. & Sciutto, E. (1990) Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 114, 926-928.

- Miller, B.L., Heiner, D. & Goldberg, M.A. (1983) The immunology of cerebral cysticercosis. *Bulletin of Clinical Neurosciences* 48, 18-23.
- Morakote, N., Nawacharoen, W., Sukonthasun, K., Thammasonthi, W. & Khamboonruang, C. (1992) Comparison of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 23, 77-81.
- Nascimento, E. & Mayrink, W. (1984) Avaliação de antígenos de *Cysticercus cellulosae* no imunodiagnóstico da cisticercose humana pela hemaglutinação indireta. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 26, 289-294.
- Nascimento, E., Nogueira, P.M.P. & Tavares, C.A.P. (1987) Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. *Parasitology Research* 73, 446-450.
- Ng, T.F. & Ko, R.C. (1994) Serodiagnosis of cysticercosis: specificity of different antigens and enzyme-linked immunosorbent assays. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88, 421-422.
- Noujaim, S.E., Rossi, M.D., Rao, S.K., Cacciarelli, A.A., Mendonca, R.A., Wang, A.M. & Coelho, F.H. (1999) CT and MR imaging of neurocysticercosis. *American Journal of Roentgenology* 173, 1485-1490.
- Palacios, E., Lujambio, P.S. & Jasso, R.R. (1997) Computed tomography and magnetic resonance imaging of neurocysticercosis. *Seminars in Roentgenology* 32, 325-334.
- Pammenter, M.D. & Rossouw, E.J. (1987) The value of an antigenic fraction of *Cysticercus cellulosae* in the serodiagnosis of cysticercosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 81, 117-123.
- Pialarissi, C.S.M., Vaz, A.J., Souza, A.M.C., Nakamura, P.M., Camargo, E.D., Silva, M.V. & Ueda, M. (1987) Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 29, 367-373.

- Pittella, J.E.H. (1997) Neurocysticercosis. *Brain Pathology* 7, 681-693.
- Román, G., Sotelo, J., Del Brutto, O., Flisser, A., Dumas, M., Wadia, N., Botero, D., Cruz, M., Garcia, H., Bittencourt, P.R.M., Trelles, L., Arriagada, C., Lorenzana, P., Nash, T.E. & Spina-França, A. (2000) A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bulletin of the World Health Organization* 78, 399-406.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Laclette, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L. & Larralde, C. (2000) *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection* 2, 1875-1890.
- Silva, A.D.T., Quagliato, E.M.A.B. & Rossi, C.L. (2000) A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis using a purified fraction from *Taenia solium* cysticerci. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37, 87-92.
- Sotelo, J. & Del Brutto, O.H. (2000) Brain cysticercosis: a review. *Archives of Medical Research* 31, 3-14.
- Sotelo, J., Guerrero, V. & Rubio, F. (1985) Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Archives of Internal Medicine* 145, 442-445.
- Spina-França, A., Livramento, J.A. & Machado, L.R. (1993) Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 51, 16-20.
- Takayanagui, O.M. & Leite, J.P. (2001) Neurocisticercose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34, 283-290.

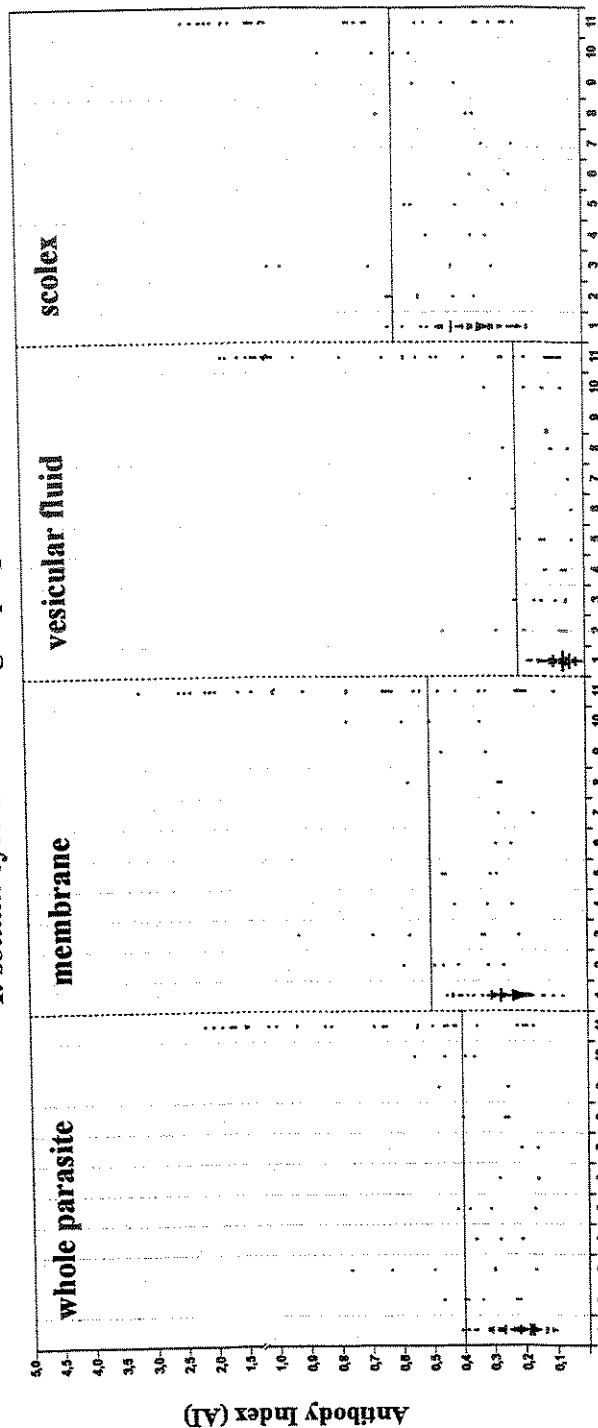
- Tsang, V.C.W., Brand, J.A. & Boyer, A.E. (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infectious Diseases* 159, 50-59.
- Vaz, A.J., Nakamura, P.M., Camargo, M.E., Camargo, E.D. & Ferreira, A.W. (1996) 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. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 38, 391-396.
- White Jr, A.C. (1997) Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clinical Infectious Diseases* 24, 101-115.
- Wilson, M., Bryan, R.T., Fried, J.A., Ware, D.A., Schantz, P.M., Pilcher, J.B. & Tsang, V.C.W. (1991) Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *Journal of Infectious Diseases* 164, 1007-1009.
- Youden, W.J. (1950) Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3, 32-35.
- Zini, D., Farrell, V.J.R. & Wadee, A.A. (1990) The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 53, 656-661.

Table 1. Performance of ELISA with different cysticercal antigen preparations

Antigen	Cut-off (AI)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
TsoW	0.40	83	89
TsoMe	0.50	70	91
TsoVF	0.20	80	93
TsoSc	0.60	70	89
TcraW	0.50	67	86
TcraMe	0.55	70	78
TcraVF	0.50	77	94

Tso, *Taenia solium*; Tcra, *Taenia crassiceps*; W, whole parasite; Me, membrane VF, vesicular fluid; Sc, scolex. AI=antibody index.

T. solium cysticercal antigen preparations



T. crassiceps cysticercal antigen preparations

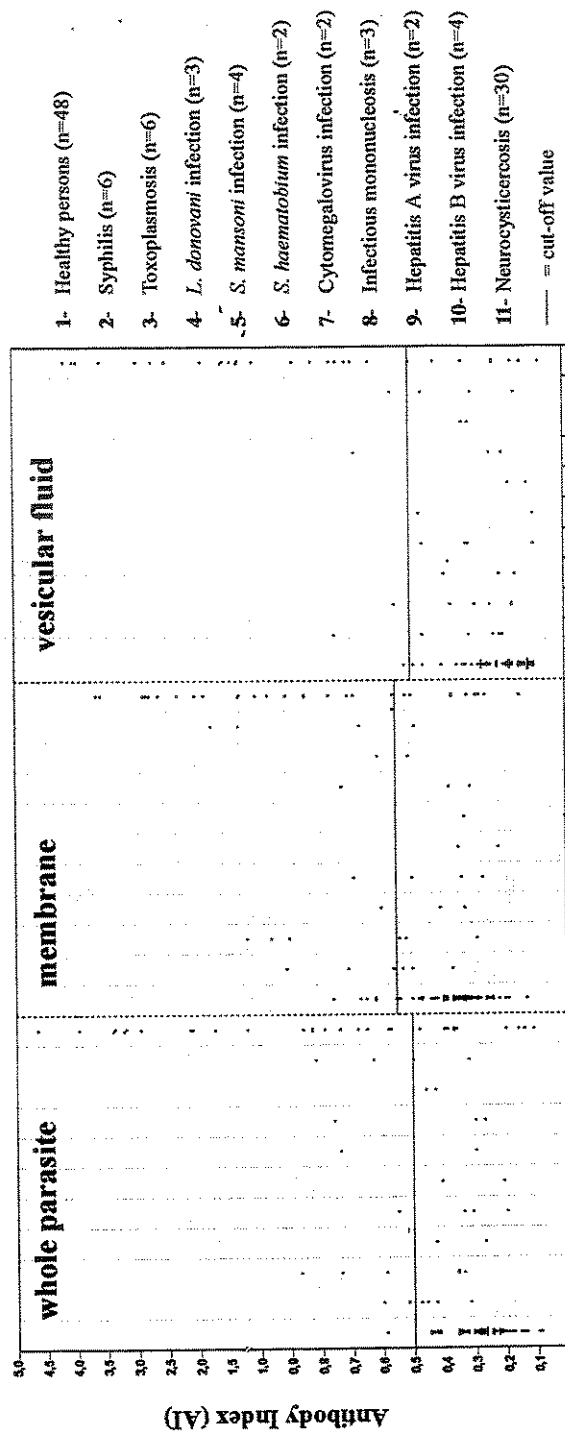
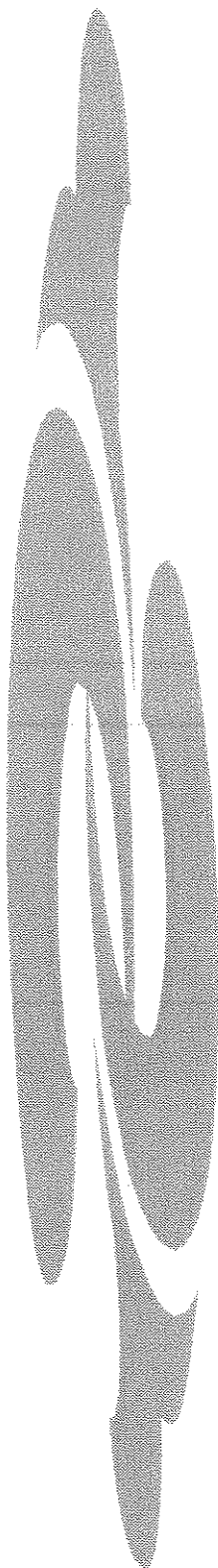


FIGURE 1. ITI ICA results in patients with neurocysticercosis, individuals with other infections and healthy persons.



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 terapêutica.

No SNC, os cisticercos podem se alojar no parênquima, espaço subaracnóideo, sistema ventricular ou medula espinhal. As manifestações clínicas da neurocisticercose são usualmente resultantes do efeito mecânico de compressão de estruturas nervosas e de processos obstrutivos causados pelos parasitas e das respostas inflamatória e imune do hospedeiro (FLISSER *et al.*, 1980; NASH & NEVA, 1984; DEL BRUTTO & SOTELO, 1988; WHITE, 1997; OSTROSKY-ZEICHNER & ESTAÑOL, 1999; SOTELO & DEL BRUTTO, 2000). Alterações compressivas podem ser resultantes do efeito de massa produzido por um cisticerco volumoso ou de vários cisticercos pequenos. Processos obstrutivos causados por cisticercos localizados nos ventrículos ou no espaço subaracnóideo podem resultar no bloqueio da circulação do LCR. Ao se instalar no SNC, a oncosfera provoca uma reação inflamatória discreta. A reação inflamatória mais intensa é observada com a morte do cisticerco, quando há a liberação de substâncias imunogênicas. Nesta fase, há recrutamento de linfócitos, eosinófilos, granulócitos e plasmócitos, podendo haver alterações na barreira hematoencefálica, determinando manifestações clínicas e sinalização líquórica, com repercussões nos procedimentos de neuroimagem e nos testes de análise do soro e/ou LCR (LIVRAMENTO, 1987; WHITE, 1997; CARPIO *et al.*, 1998; OSTROSKY-ZEICHNER & ESTAÑOL, 1999). A resposta imune do hospedeiro é muito heterogênea, com diferentes graus de intensidade, podendo ocorrer inclusive tolerância imunológica ao parasita (FLISSER *et al.*, 1980; WHITE, 1997; CARPIO *et al.*, 1998).

O diagnóstico da neurocisticercose é baseado em dados clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e de imagem. Os procedimentos de neuroimagem e as técnicas laboratoriais de análise do soro e/ou LCR 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 permitem a visualização do cisticerco ou de estruturas comparáveis em tamanho ao parasita, auxiliando no diagnóstico, no prognóstico e no acompanhamento

da evolução da infecção. Em virtude das limitações técnicas da TC e RMN, alguns autores sugerem que os dois procedimentos se complementam, devendo, sempre que possível, ser utilizados em conjunto nos pacientes com suspeita clínica de neurocisticercose (SCIUTTO *et. al.*, 2000). O número de casos diagnosticados de neurocisticercose tem aumentado significativamente nos últimos anos, devido à utilização dos exames de neuroimagem. Entretanto, esses procedimentos são muito sofisticados e inacessíveis à maioria dos centros de saúde de países em desenvolvimento que, no caso, são os mais afetados pela infecção com *T. solium*. Deste modo, as técnicas de análise do LCR e soro têm grande utilidade para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da neurocisticercose.

A detecção de anticorpos anti-cisticercos em amostras de soro e/ou LCR tem sido um instrumento valioso para o diagnóstico da neurocisticercose (DEL BRUTTO *et al.*, 2001). Embora a literatura especializada registre muitos artigos sobre o imunodiagnóstico da neurocisticercose, existem poucos trabalhos comparando simultaneamente a eficácia de preparações antigênicas de cisticercos para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose. Nascimento & Mayrink (1984) avaliaram preparações antigênicas de cisticercos de *T. solium* para o imunodiagnóstico da neurocisticercose utilizando um teste de HI. O extrato bruto de escólex (TsoEsc) e uma fração do mesmo purificada por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (SPA) apresentaram maior especificidade do que os extratos brutos total, de membrana e de líquido vesicular. Em 25 amostras de soros de pacientes com neurocisticercose, as reações de HI com TsoEsc e SPA apresentaram sensibilidades de 80% e 84%, respectivamente. Nascimento *et al.* (1987) pesquisaram anticorpos anti-cisticercos com as técnicas de HI e ELISA, utilizando como preparações antigênicas um extrato bruto total de cisticercos de *T. solium* (CAE) e a fração SPA. Analisando uma bateria de 153 amostras de soros (22 de pacientes com neurocisticercose, 48 de pacientes com teníase, 59 de pacientes com outras parasitoses e 24 de pacientes recém-nascidos) com os testes de HI e ELISA, os autores mostraram que a distinção sorológica entre pacientes infectados e não infectados ficava mais evidente quando a fração SPA era utilizada como antígeno. No teste de HI, anticorpos séricos foram detectados em 73% dos pacientes utilizando CAE e em 86% dos casos usando SPA. No teste ELISA, 63% dos pacientes foram positivos quando a preparação antigênica CAE foi utilizada e em 91% utilizando SPA. Costa (1986) estudou a eficácia de cinco preparações antigênicas diferentes

de cisticercos de *T. solium* para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose usando ELISA e uma bateria de 182 amostras de soros (35 de pacientes com neurocisticercose, 57 de pacientes com outras infecções e 90 de doadores de sangue). A técnica ELISA apresentou sensibilidade de 88,6% para as preparações antigênicas de membrana, de escólex e de líquido vesicular, 85,7% para um extrato salino total e 62,8% para um extrato alcalino total, sendo a especificidade de 100% para as cinco preparações antigênicas estudadas. Em 1986, Larralde *et al.*, mostraram que as técnicas de HI e ELISA com líquido vesicular de cisticercos de *T. solium* como antígeno, apresentaram 80-90% de sensibilidade em uma área endêmica para cisticercose e 95% de sensibilidade em uma área não endêmica. Baily *et al.* (1988) utilizando ELISA com preparações antigênicas de líquido vesicular, de escólex e de membrana de cisticercos de *T. solium*, mostraram que os soros de pacientes com neurocisticercose eram mais reativos com o líquido vesicular e menos reativos com a preparação antigênica de membrana. Morakote *et al.* (1992) avaliaram técnicas ELISA para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose utilizando como antígenos um extrato de escólex e membrana (ELISA-CS) e líquido vesicular (ELISA-CF) de cisticercos de *T. solium*. Em uma bateria de 62 amostras de soros (32 de pacientes com neurocisticercose e 30 de pacientes com outras parasitoses), a técnica ELISA-CS apresentou sensibilidade de 78,1% e especificidade de 93,3%, enquanto que a sensibilidade e especificidade da técnica ELISA-CF foram, respectivamente, 81,3% e 100%. Dekumyoy *et al.* (2000) mostraram que a técnica ELISA com líquido vesicular de cisticercos de *T. solium*, apresentou 90,5% de sensibilidade para 21 soros de pacientes com neurocisticercose e 89,3% de especificidade para 234 soros de diferentes infecções parasitárias.

Com a dificuldade crescente de obtenção de porcos infectados com cisticercos, preparações antigênicas de cisticercos de *T. crassiceps* começaram a ser avaliadas para o imunodiagnóstico da neurocisticercose. Kunz *et al.* (1989), avaliando o desempenho da técnica ELISA com líquido vesicular de *T. solium* (ELISA-TsoLV) e de *T. crassiceps* (ELISA-TcraLV) em amostras de soros de 14 pacientes com neurocisticercose, mostraram que ambos os ensaios apresentaram sensibilidade suficiente para detectar anticorpos em todos soros dos pacientes testados, embora resultados com maior absorbância fossem observados na reação ELISA-TsoLV. Larralde *et al.* (1990) mostraram que preparações

antigênicas de membrana e de líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* apresentaram a mesma eficácia do que as preparações análogas de cisticercos de *T. solium*, em reações ELISA para a detecção de anticorpos específicos em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose. Essas publicações estimularam outros trabalhos relacionados com a avaliação da eficácia do líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* em reações imunoenzimáticas para a detecção de anticorpos específicos em amostras de LCR e/ou soros. Bueno *et al.* (2000) utilizaram técnicas ELISA empregando como antígeno o líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* (ELISA-Tcra) e um extrato salino total de cisticercos de *T. solium* (ELISA-Tso), para analisar uma bateria de 126 amostras de soros (68 de pacientes com neurocisticercose, 23 de indivíduos com outras parasitoses e 35 de pessoas sadias). As técnicas ELISA-Tcra e ELISA-Tso apresentaram, respectivamente, 91,2% e 70,6% de sensibilidade, enquanto que a especificidade de ambos ensaios foi 80%. Bueno *et al.* (2001) compararam o desempenho da técnica ELISA-Tcra com aquele obtido com a técnica ELISA utilizando como antígeno um extrato de escólex e membrana de cisticercos de *T. solium* (ELISA-Tso) para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose. Em uma bateria de 175 amostras de soros (24 de pacientes com neurocisticercose, 45 de pacientes com outras parasitoses, 76 de doadores de sangue e 30 de indivíduos supostamente sadios) a sensibilidade de ambos ensaios foi 100%, enquanto que as especificidades das técnicas ELISA-Tcra e ELISA-Tso foram, respectivamente, 96,7% e 90%.

Como já ressaltado, a técnica ELISA tem sido muito utilizada para a avaliação de preparações antigênicas para o diagnóstico da neurocisticercose. Entretanto, as características das técnicas ELISA utilizadas e o número limitado de preparações antigênicas testadas simultaneamente têm dificultado a interpretação dos resultados obtidos. No presente estudo, a eficácia de sete diferentes preparações antigênicas, quatro de cisticercos de *T. solium* (extratos brutos total-TsoW, de membrana-TsoMe, de líquido vesicular-TsoLV e de escólex-TsoEsc) e três de cisticercos de *T. crassiceps* (extratos brutos total-TcraW, de membrana-TcraMe e de líquido vesicular-TcraLV), foi avaliada para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose usando uma técnica ELISA quantitativa. A avaliação foi realizada com 30 soros de pacientes com neurocisticercose, 32 soros de pacientes com infecções heterólogas (sífilis, toxoplasmose, leishmaniose, esquistossomose,

citomegalovirose, mononucleose infecciosa, hepatite viral A e B) e 48 soros de pessoas saudáveis. Quatro pacientes apresentaram amostras de soros negativas com todas as sete preparações antigênicas. Esses quatro pacientes vêm sendo seguidos por períodos de tempo que variam de 2 a 5 anos, com estudos de neuroimagem e resultados de ELISA em amostras de LCR compatíveis com neurocisticercose. Vários estudos têm mostrado que os testes imunológicos para neurocisticercose apresentam menor probabilidade de reatividade em pacientes com cistos calcificados do que em pacientes apresentando parasitas em outros estágios evolutivos (ESPINOZA *et al.*, 1986; PAMMENTER & ROSSOUW, 1987; BAILY *et al.*, 1988; CHANG *et al.*, 1988; WILSON *et al.*, 1991; WHITE, 1997; SCIUTTO *et al.*, 2000). Das quatro amostras de soros não reagentes com todas as preparações antigênicas, uma amostra foi de um paciente apresentando somente cistos calcificados.

Considerando os resultados dos testes ELISA com os extratos brutos totais de cisticercos, a técnica TsoW-ELISA apresentou melhor desempenho do que a técnica TcraW-ELISA, principalmente em termos de sensibilidade. Cinco soros de pacientes com neurocisticercose foram positivos com a técnica TsoW-ELISA e negativos com a técnica TcraW-ELISA. Duas dessas cinco amostras foram de pacientes que apresentavam somente cistos calcificados. A técnica ELISA com extratos de membranas de cisticercos de *T. solium* (TsoMe-ELISA) e *T. crassiceps* (TcraMe-ELISA) e extrato de escólex de cisticercos de *T. solium* (TsoEsc-ELISA) mostraram um baixo desempenho. As especificidades das técnicas TsoMe-ELISA, TsoEsc-ELISA e TcraMe-ELISA foram, respectivamente, 91%, 89% e 78%, enquanto que a sensibilidade dos três ensaios foi 70%. O desempenho da técnica TsoLV-ELISA (80% de sensibilidade; 93% de especificidade) foi similar ao desempenho da técnica TsoW-ELISA (83% de sensibilidade; 89% de especificidade), enquanto que o desempenho da técnica TcraLV-ELISA (77% de sensibilidade; 94% de especificidade) foi superior ao desempenho da técnica TcraW-ELISA (67% de sensibilidade; 86% de especificidade).

Praticamente todos os testes imunológicos convencionais têm sido utilizados na pesquisa de anticorpos anti-cisticercos. 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, incluindo a existência de diferenças antigênicas nos cisticercos,

a evasão e a supressão da resposta imune por parte dos parasitas e o efeito imunossupressor do tratamento freqüentemente administrado aos pacientes (FLISSER *et al.*, 1980; MILLER *et al.*, 1983; WHITE, 1997; SCIUTTO *et al.*, 2000). Além disto, a resposta imune do hospedeiro depende do número, localização e estágio evolutivo dos cisticercos no SNC (FLISSER, PÉREZ-MONTFORT, LARRALDE, 1979; FLISSER *et al.*, 1980; CHANG *et al.*, 1988; ZINI *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1991; WHITE, 1997; SCIUTTO *et al.*, 2000).

A grande dificuldade na sorologia para neurocisticercose é a reatividade cruzada entre antígenos de cisticercos e soros de pacientes com outras infecções (WHITE, 1997; SCIUTTO *et al.*, 2000). Reações cruzadas com extratos totais de cisticercos de *T. solium* têm sido descritas com soros de várias infecções, incluindo equinococose, esquistossomose, fasciolíase, angiostrongilíase, ascaridíase, filariose, toxoplasmose e himenolepiíase (ARAMBULO *et al.*, 1978; DIWAN *et al.*, 1982; MILLER *et al.*, 1983; DIAZ *et al.*, 1992; NG & KO, 1994; DEKUMYOY *et al.*, 1998; SILVA, QUAGLIATO, ROSSI, 2000). No presente estudo, reações cruzadas com as preparações antigênicas TsoW e TcraW foram observadas com amostras de soros de pacientes com sífilis, esquistossomose mansônica, hepatite viral B e toxoplasmose. Reações cruzadas somente com a preparação antigênica TsoW foram observadas em um paciente com hepatite viral A, enquanto que reações cruzadas somente com a preparação antigênica TcraW foram observadas em um paciente com citomegalovirose e em um paciente com mononucleose infecciosa. Além disso, duas amostras de soros de pessoas sadias reagiram com os extratos totais, uma com TsoW e outra com TcraW. Estas pessoas não apresentavam evidências de neurocisticercose e a causa da positividade ainda não é conhecida. Nossos resultados confirmam que o líquido vesicular obtido de cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* pode ser útil para o imunodiagnóstico da neurocisticercose. Porém, reações cruzadas com amostras de soros de pacientes com sífilis, toxoplasmose, mononucleose infecciosa e hepatite viral B foram detectadas com as preparações antigênicas TsoLV e TcraLV. Reações cruzadas somente com a preparação antigênica TsoLV foram observadas em amostras de soros de um paciente com citomegalovirose e um paciente com infecção por *S. haematobium*. Uma amostra de soro de uma pessoa sadia também foi reativa com a preparação antigênica TcraLV. Esta pessoa não apresentava evidências de neurocisticercose e a causa da

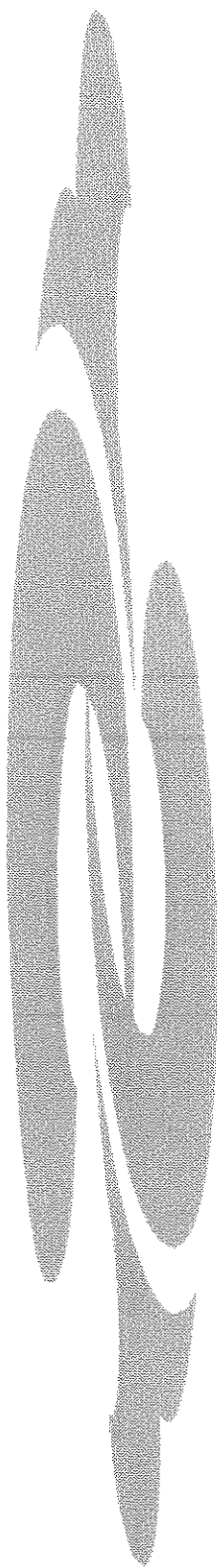
positividade ainda não é conhecida. Outros estudos também mostraram que componentes do líquido vesicular de cisticercos de *T. solium* eram reconhecidos por anticorpos presentes em amostras de soros de indivíduos com outras infecções, incluindo equinococose, oncocercose, estrongiloidíase, angiostrongilíase, ascaridíase, toxocariase e infecção com *Gnathostoma sp* (ZINI, *et al.*, 1990; MORAKOTE *et al.*, 1992; NG & KO, *et al.*, 1994; DEKUMYOY *et al.*, 2000).

Variações nas performances de reações imunológicas para o diagnóstico da neurocisticercose são esperadas e provavelmente estão relacionadas com vários fatores, incluindo os critérios utilizados para seleção dos pacientes com neurocisticercose e outras infecções bem como as pessoas sadias, a heterogeneidade dos pacientes com neurocisticercose estudados, o tempo decorrido entre o início da infecção e a coleta das amostras de soros ou LCR, o número, localização e estágio evolutivo dos parasitas, o estado imune dos pacientes à época da coleta de soro ou LCR, as propriedades intrínsecas das técnicas usadas para detecção de anticorpos e os métodos utilizados para expressão dos resultados e cálculo do valor do “cut-off” das reações.

No presente estudo, o índice J (YAUDEN, 1950) foi utilizado para definir o valor do “cut-off” das reações. Outro método muito usado para o cálculo do “cut-off” é baseado na média dos resultados obtidos com pessoas sadias mais dois desvios-padrão. Usando esta metodologia, sensibilidades diferentes foram observadas somente com as técnicas TsoMe-ELISA (73%) e TcraMe-ELISA (63%). Com exceção da técnica TcraMe-ELISA que apresentou 84% de especificidade, todas as outras técnicas de ELISA apresentaram valores de especificidade (80 a 86%) menores do que os obtidos utilizando o índice J.

A incorporação de um soro padrão positivo para cisticercose (CYSP) testado com todas as sete preparações antigênicas em todas as placas de reações e a expressão dos resultados como um índice de anticorpos (IA = Densidades ópticas (DO) obtidas com as amostras de soros/DO obtida com CYSP) reduziu bastante a variabilidade da reatividade da técnica ELISA. A produção e disponibilização de um padrão positivo para cisticercose por uma instituição internacional e sua inclusão em reações imunológicas, como a técnica ELISA, poderiam permitir uma comparação mais confiável dos resultados obtidos por diferentes laboratórios.

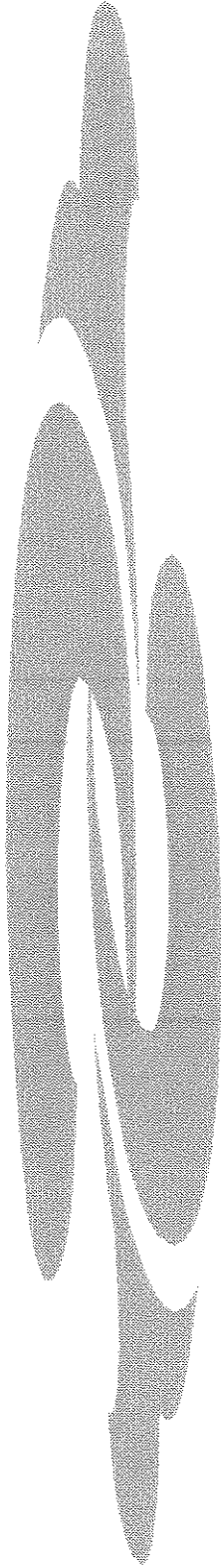
Nenhuma das preparações antigênicas utilizadas no presente estudo apresentou uma performance excepcional. Entretanto, considerando os resultados obtidos com todas as preparações antigênicas, o líquido vesicular de cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* pode ser útil em reações imunológicas para a detecção de anticorpos específicos em soros de pacientes com neurocisticercose.



4. CONCLUSÕES

No presente estudo, a eficácia de preparações antigênicas obtidas de cisticercos de *T. solium* (extratos brutos total-TsoW, de membrana-TsoMe, de líquido vesicular-TsoLV e de escólex-TsoEsc) e de *T. crassiceps* (extratos brutos total-TcraW, de membrana-TcraMe e de líquido vesicular-TcraLV), foi avaliada para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose, usando uma técnica ELISA quantitativa.

Nenhuma das preparações antigênicas utilizadas no presente estudo apresentou uma performance excepcional. Entretanto, considerando os resultados obtidos com todas as preparações antigênicas, o líquido vesicular de cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* pode ser útil em reações imunológicas para a detecção de anticorpos específicos em soros de pacientes com neurocisticercose.



5. SUMMARY

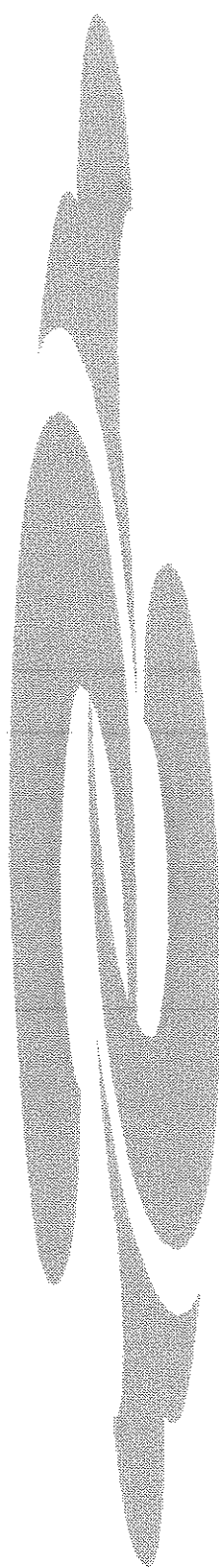
Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis.

Neurocysticercosis is an important cause of neurological disease in many developing countries. The clinical diagnosis of neurocysticercosis is impaired by the polymorphism and nonspecificity of the symptoms. Neuroimaging techniques such as computed tomography and magnetic resonance imaging 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. In these circumstances, the detection of cysticercus-specific antibodies is of considerable value for the diagnosis of neurocysticercosis.

A positive immunological test for *T. solium* cysticercal antigens in CSF samples has been considered an important criterion for the diagnosis of neurocysticercosis. However, the use of serum samples for the immunodiagnosis of neurocysticercosis has some advantages: serum can be obtained in a less invasive manner than CSF, serum epidemiological studies can map areas of endemicity, and serum analysis can be very useful for cross-reactivity studies.

In the present study, the usefulness of seven cysticercal antigen extracts, four from *T. solium* cysticerci (whole parasite-TsoW, membrane-TsoMe, vesicular fluid-TsoVF and scolex-TsoSc) and three from *T. crassiceps* cysticerci (whole parasite-TcraW, membrane-TcraMe and vesicular fluid-TcraVF), for serodiagnosis of neurocysticercosis was evaluated using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Cysticercus*-specific IgG were screened in serum samples from 30 patients with neurocysticercosis, 32 patients with other infections and 48 healthy persons. The TsoW-ELISA showed 83% sensitivity and 89% specificity, whereas the sensitivity and specificity of the TcraW-ELISA were 67% and 86%, respectively. The specificities for the TsoMe-ELISA, TsoSc-ELISA and TcraMe-ELISA were, respectively, 91%, 89% and 78%, whereas the sensitivity for all three assays was 70%. The performance of the TsoVF-ELISA (80% sensitivity; 93% specificity) was similar to that of the TsoW-ELISA, whereas the performance of the TcraVF-ELISA (77% sensitivity; 94% specificity) was superior to that of the TcraW-ELISA. None of the antigen

preparations from *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci used in this study showed outstanding performance for the serodiagnosis of neurocysticercosis. However, considering the results obtained with the seven antigen preparations, vesicular fluid from *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci may be useful for detecting specific antibodies in sera from patients with neurocysticercosis.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPEJEV, S. – Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, **38**: 207-16, 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.
- BAILY, G.G.; MASON, P.R.; TRIJSSENAAR, F.E.J.; LYONS, N.F. – Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA tests using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, **82**: 295-9, 1988.
- 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. **Neurobiol**, **42**: 231-8, 1979.
- BIAGI, F.F. & PINHÃ, A.P. – Presence of antigens in calcareous corpuscles of cysticercus. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, **6**: 114-6, 1964.
- BUENO, E.C.; SNEGE, M.; VAZ, A.J.; LESER, P.G. – Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci. **Clin Diagn Lab Immunol**, **8**: 1140-4, 2001.
- BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; MIELLE, S.R. – Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **J Clin Microbiol**, **38**: 146-51, 2000.
- CANELAS, H.M. - Neurocisticercose: incidência, diagnóstico e formas clínicas. **Arq Neuro-Psiquiatr**, **20**: 1-16, 1962.

- CARPIO, A.; ESCOBAR, A.; HAUSER, W.A. - Cysticercosis and epilepsy: a critical review. **Epilepsia**, **39**: 1025-40, 1998.
- 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 neurocysticercosis. **Am J Neuroradiol**, **9**: 125-30, 1988.
- 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.
- COSTA, J.M. – Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose: estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e de líquido cefalorraqueano. **Arq Neuro-Psiquiatr**, **44**: 15-31, 1986.
- DEKUMYOY, P.; ANANTAPHRUTI, M.T.; NUAMTANONG, S.; WATTHANAKULPANICH, D.; WAIKAGUL, J.; DANIS, M. – Neurocysticercosis: utilizing the cystic fluid antigen from *Taenia solium* metacestodes for diagnosis by IgG-ELISA. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, **31**: 21-5, 2000.
- DEKUMYOY, P.; VANIJANONTA, S.; WAIKAGUL, J.; SA-NGUANKIAT, S.; DANIS, M. – Use of delipidized antigens of *Taenia solium* metacestodes in IgG- ELISA for detection of neurocysticercosis. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, **29**: 572-8, 1998.
- DEL BRUTTO, O.H. – Neurocysticercosis. **Curr Opin Neurol**, **10**: 268-72, 1997.
- DEL BRUTTO, O.H. – Neurocisticercosis. **Rev Neurol**, **29**: 456-66, 1999.

- DEL BRUTTO, O.H.- Proposal diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, **58**: 1315-6, 2002.
- DEL BRUTTO, O.H.; RAJSHEKHAR, V.; WHITE Jr, A.C.; TSANG, V.C.W.; NASH, T.E.; TAKAYANAGUI, O.M.; SCHANTZ, P.M.; EVANS, C.A.W.; FLISSER, A.; CORREA, D.; BOTERO, D.; ALLAN, J.C.; SARTI, E.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; GARCIA, H.H. – Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, **57**: 177-83, 2001.
- 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. – 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.
- DIWAN, A.R.; COKER-VANN, M.; BROWN, P.; SUBIANTO, D.B.; YOLKEN, R.; DESOWITZ, R.; ESCOBAR, A.; GIBBS Jr, C.J.; GAJDUSEK, D.C. – Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. **Am J Trop Med Hyg**, **31**: 364-9, 1982.
- 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.
- 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.

- 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: a review. **Bull World Health Organ**, 57: 839-56, 1979.
- FLISSER, A.; WOODHOUSE, E.; LARRALDE, C. – Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. **Clin Exp Immunol**, 39: 27-37, 1980.
- FREEMAN, R. S. – Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. **Can J Zool**, 40: 969-90, 1962.
- 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.
- GARG, R.K. – Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, 58: 1315, 2002.
- GARG, R.K.; KAR, A.M.; KUMAR, T. – Neurocysticercosis like presentation in a case of CNS tuberculosis. **Neurol India**, 48: 260-2, 2000.
- GOBBI, H.; ADAD, S.J.; NEVES, R.R.; ALMEIDA, H.O. – Ocorrência de cisticercose (*Cysticercus cellulosae*) em pacientes necropsiados em Uberaba, MG. **Rev Pat Trop**, 9: 51-9, 1980.

- 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.
- KATTI, M.K. – Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, **58**: 1315, 2002.
- KUNZ, J.; KALINNA, B.; WATSCHKE, V.; GEYER, E. - *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. **Zbl Bakt**, **271**: 510-20, 1989.
- LANGE, O. – Síndrome líquórica da cisticercose encéfalo-meningea. **Rev Neurol Psiquiatr**, **6**: 35-48, 1940.
- LARRALDE, C.; LACLETTE, J.P.; OWEN, C.S.; MADRAZO, I.; SANDOVAL, M.; BOJALIL, R.; SCIUTTO, E.; CONTRERAS, L.; ARZATE, J.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T.; MONTOYA, R.M.; GOODSID, F. – Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. **Am J Trop Med Hyg**, **35**: 965-73, 1986.
- 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.

- LIVRAMENTO, J.A. – Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. **Arq Neuro-Psiquiatr**, 39: 261-78, 1981.
- LIVRAMENTO, J.A. – Síndrome do líquido cefalorraquiano na neurocisticercose. **Arq Neuro-Psiquiatr**, 45: 261-75, 1987.
- MACHADO, A.B.B.; PIALARISSI, C.S.M.; VAZ, A.J. - Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral, São Paulo, SP (Brasil). **Rev Saúde Públ**, 22: 240-4, 1988.
- MADDISON, S.E. – The present status of serodiagnosis and seroepidemiology of schistosomiasis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 7: 93-105, 1987.
- MAHAJAN, R.C. - Geographical distribution of human cysticercosis. In: FLISSER, A., ed., **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives**. New York, Academic Press, 1982. p. 39-46.
- MILLER, B.L.; HEINER, D.; GOLDBERG, M.A. – The immunology of cerebral cysticercosis. **Bull Clin Neurosci**, 48: 18-23, 1983.
- MORAKOTE, N.; NAWACHAROEN, W.; SUKONTHASUN, K.; THAMMASONTHI, W.; KHAMBOONRUANG, C. – Comparison of cysticercus extrat, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 23: 77-81, 1992.
- MOSES, A. – Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cisticercoses. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 3: 320-7, 1911.

- NASCIMENTO, E. & MAYRINK, W. – Avaliação de antígenos de *Cysticercus cellulosae* no imunodiagnóstico da cisticercose humana pela hemaglutinação indireta. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 26: 289-94, 1984.
- 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: 1492-6, 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.
- NOUJAIM, S.E.; ROSSI, M.D.; RAO, S.K.; CACCIARELLI, A.A.; MENDONCA, R.A.; WANG, A.M.; COELHO, F.H. – CT and MR imaging of neurocysticercosis. **Am J Roentgenol**, 173: 1485-90, 1999.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. & ESTAÑOL, B. – Immunopathogenesis of neurocysticercosis: is damage mediated by the host immune response? **Intern J Parasit**, 29: 649-50, 1999.
- PALACIOS, E.; LUJAMBIO, P.S.; JASSO, R.R. – Computed tomography and magnetic resonance imaging of neurocysticercosis: a review. **Semin Roentgenol**, 32: 325-34, 1997.
- PAMMENTER, M.D. & ROSSOUW, E.J. – The value of an antigenic fraction of *Cysticercus cellulosae* in the serodiagnosis of cysticercosis. **Ann Trop Med Parasitol**, 81: 117-23, 1987.

- 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.
- PITTELLA, J.E.H. – Neurocysticercosis. **Brain Pathol**, 7: 681-93, 1997.
- PLANCARTE, A.; FEXAS, M. & FLISSER, A. – Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Int J Parasitol**, 24: 733-8, 1994.
- PROCTOR, E.M.; POWELL, S.J.; ELSDON-DEW, R. – The serological diagnosis of cysticercosis. **Ann Trop Med Parasitol**, 60: 146-51, 1966.
- REIS, J.B. & BEI, A. – A fixação de complemento para o diagnóstico da sífilis e da neurocisticercose no líquido cefalorraquiano pela técnica de Wadsworth-Maltaner e Maltaner. **Rev Paul Med**, 53: 439-58, 1958.
- REIS-FILHO, J.B.; REIS, J.B.; BEI, A. – Reação de fixação de complemento no diagnóstico da neurocisticercose. **Neurobiologia**, 48: 227-32, 1985.
- ROMÁN, G.; SOTELO, J.; DEL BRUTTO, O.; FLISSER, A.; DUMAS, M.; WADIA, N.; BOTERO, D.; CRUZ, M.; GARCIA, H.; BITTENCOURT, P.R.M.; TRELLES, L.; ARRIAGADA, C.; LORENZANA, P.; NASH, T.E.; SPINA-FRANÇA, A. – A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. **Bull World Health Org**, 78: 399-406, 2000.
- SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; RUGIERO, E.; CONTRERAS, M.C. – Diagnóstico de la neurocysticercosis humana mediante ELISA-IgG usando un antígeno purificado. **Bol Chil Parasitol**, 51: 85-90, 1996.

- SCHANTZ, P.M. - Surveillance and control programs for cestode diseases: in Miller M. J., Love E. J. ed. **Parasitic Diseases: Treatment and Control**. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 275- 90, 1989.
- SCHARF, D. - Neurocysticercosis. Two hundred thirty-eight cases from a California hospital . **Arch Neurol**, **45**: 777-80, 1988.
- SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LACLETTE, J.P.; SOTELO, J.; ALUJA, A .; VARGAS, L.; LARRALDE, C. - *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. **Microbes Infect**, **2**: 1875-90, 2000.
- SILVA, A.D.T.; QUAGLIATO, E.M.A.B.; ROSSI, C.L. - A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis using a purified fraction from *Taenia solium* cysticerci. **Diagn Microbiol Infect Dis**, **37**: 87-92, 2000.
- SIMONETTI, A.B. & TEIXEIRA, J. - Behavior of the indirect immunofluorescence reaction and of cerebrospinal fluid parameters in neurocysticercosis. **Arq Neuro-Psiquiatr**, **45**: 33-43, 1987.
- SOTELO, J. & DEL BRUTTO, O.H. - Brain cysticercosis: a review. **Arch Med Res**, **31**: 3-14, 2000.
- 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.
- SOUZA, A.Q.; SA, H.L.C.; QUEIROZ, T.R.B.S.; HORTA, W.G.; PEARSON, R.D. - Neurocysticercosis in Ceará state, Northeastern Brazil: a review of 119 cases. **Am J Trop Med Hyg**, **58**: 759-62, 1998.

SPINA-FRANÇA, A. – Cisticercose do sistema nervoso central. Considerações sobre 50 casos. **Rev Paul Med**, 48: 59-70, 1956.

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 (1929-1962). **Arq Neuro-Psiquiatr**, 51: 16-20, 1993.

TAKAYANAGUI, O.M. & JARDIM, E. - Aspectos clínicos da neurocisticercose. Análise de 500 casos. **Arq Neuro-Psiquiatr**, 41: 50-63, 1983.

TAKAYANAGUI, O.M. & LEITE, J.P. – Neurocisticercose. **Rev Soc Bras Med Trop**, 34: 283-90, 2001.

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.

UEDA, M.; VAZ, A.J.; CAMARGO, E.D.; SOUZA, A.M.C.; BENELLI, R.M.F.; SILVA, M.V. – Passive haemagglutination test for human neurocysticercosis immunodiagnosis. II – Comparison of two standardized procedures for the passive haemagglutination reagent in the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in cerebrospinal fluids. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 30: 57-62, 1988.

VAZ, A.J. & FERREIRA, A.W. – Imunodiagnóstico da neurocisticercose: teste imunoenzimático com antígenos quimicamente ligados a suportes para pesquisa de anticorpos em soro e líquido cefalorraquiano. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 30: 1-10, 1988.

- 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.
- WEINBERG, G.M. – Recherché 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.
- 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.
- 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.