

CLAUDIO LÚCIO ROSSI

**"UTILIZAÇÃO DE CONJUGADOS ANTICORPO-LECTINA NO
IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE".**

TESE DE DOUTORADO

**APRESENTADA AO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNO-
LOGIA DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE CAMPINAS.**

CAMPINAS / 1986

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

CLÁUDIO LÚCIO ROSSI

Este exemplar corresponde a R. 2. 04. 001
Final da Tese defendida pelo Candidato
Cláudio Luís Rossi aprovada
pela Comissão Julgadora

19. 12. 86 M. J. Pereira

"UTILIZAÇÃO DE CONJUGADOS ANTICORPO-LECTINA NO
IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROCYSTICERCOSE".

TESE DE DOUTORADO

APRESENTADA AO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNO
LOGIA DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE CAMPINAS.

CAMPINAS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Orientador

Dr. Luis Sebastião Prigenzi

Aos meus pais.

À Vera, Ana Cláudia e
Fabiana.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Dr. Luis Sebastião Prigenzi, pela orientação, estímulo e compreensão;

Ao Dr. Ivan Mota, pelo estímulo;

Ao Dr. José Antonio Livramento e aos funcionários do Departamento de Patologia Clínica, pela colaboração.

I N D I C E

I.	INTRODUÇÃO	01
II.	OBJETIVOS	13
III.	MATERIAL E MÉTODOS	16
	1. Reagentes usados.....	17
	2. Amostras de LCR e soro.....	18
	3. Preparação do extrato bruto de cisticercos.....	19
	4. Obtenção da IgG humana.....	20
	5. Obtenção da anti-IgG humana.....	22
	6. Isolamento e purificação da aglutinina de germe de trigo.....	24
	7. Fracionamento do extrato bruto de cisticercos atra vés de cromatografia em Sephadex G-200.....	28
	8. Imunoeletroforese.....	29
	9. Dosagem de proteínas.....	30
	10. Hemácias de carneiro.....	30
	11. Absorção com hemácias de carneiro.....	30
	12. Preparação dos conjugados lectina-anticorpo.....	31
	13. Revestimento dos orifícios de placas de poliesti reno com antígeno.....	32
	14. Titulação dos conjugados.....	32
	15. Pesquisa de anticorpos usando conjugados con tendo lectinas.....	33
	16. Reação de fixação de complemento.....	34
	17. Reação de imunofluorescência indireta.....	35
IV.	RESULTADOS	37
	1. Obtenção da IgG humana.....	38

2.	Obtenção da anti-IgG humana.....	39
3.	Purificação da aglutinina de germe de trigo.....	40
4.	Detecção de anticorpos anti- <u>Cysticercus cellulosae</u> através das técnicas ERYTHRO-LIT e ENZY-LIT em LCR de pacientes com neurocisticercose e em LCR de pacientes sem suspeita clínica de neurocisti- cercose.....	43
5.	Comparação da técnica ERYTHRO-LIT com as técni- cas de fixação de complemento e de imunofluores- cência indireta.....	45
6.	Pesquisa de anticorpos contra os componentes do extrato bruto de cisticercos em LCR e soro de pacientes com lues.....	49
7.	Comportamento da técnica ERYTHRO-LIT em amostras de LCR e soro não selecionadas.....	50
8.	Fracionamento do extrato bruto de cisticercos por filtração em Sephadex G-200.....	52
9.	Localização de componentes antigênicos nas fra- ções I, II e III do extrato bruto de cisticer- cos, reconhecidos por anticorpos presentes em LCR de pacientes com neurocisticercose.....	53
10.	Verificação da necessidade de utilização de N-acetil - D- glucosamina no sistema utilizado.....	54
V.	DISCUSSÃO	55
VI.	RESUMO E CONCLUSÕES	65
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

I. INTRODUÇÃO

O homem é o hospedeiro definitivo da Taenia solium. A via usual de infestação é através do consumo de carne de porco mal cozida contendo cisticercos viáveis. Cisticercose, por outro lado, é uma infecção sistêmica que ocorre quando o homem torna-se o hospedeiro intermediário. Isto resulta da ingestão de víveres contaminados por fezes contendo ovos de Taenia solium, de autoinfecção fecal-oral ou de autoinfecção causada por peristalse reversa.

Um dos aspectos mais importantes da cisticercose é a localização frequente dos cisticercos no sistema nervoso central (SNC). A incidência de invasão do cérebro pode ser da ordem de 60% (ACHA & AGUILLAR, 1964).

Localizando-se no parênquima nervoso ou nas leptomeninges o parasita determina reações locais sob a forma de meningoencefalite com destruição do elemento neuronal do córtex cerebral, e reações a distância, sob a forma de meningite crônica, mais frequentemente localizada na base do encéfalo, acarretando com o correr do tempo bloqueio à circulação do líquido cefalorraqueano (LCR). No primeiro caso, o quadro clínico manifesta-se

por crises convulsivas associadas ou não a decadência men
tal global progressiva; no segundo caso predomina o sí
ndrome de hipertensão intracraniana (REIS et alii, 1979) .
Entretanto, a sintomatologia pode ser muito variada, e de
pende do número, idade e localização dos cisticercos no
SNC. (BIAGI & WILLMS, 1974; SHANLEY e JORDAN, 1980).

Neurocisticercose é um problema de saúde
pública importante em áreas onde as condições sanitárias
não são satisfatórias, como é o caso de grandes regiões
da Ásia, África e América Latina (CANELAS, 1962; SCHENONE
et alii, 1982).

Na América Latina, estatísticas e traba
ihos publicados apontam incidência elevada dessa doença
no México, Peru, Chile e Brasil (CANELAS, 1962; MAHAJAN ,
1982; SCHENONE et alii, 1982; WOODHOUSE, FLISSER &
LARRALDE, 1982; TAKAYANAGUI & JARDIM, 1983).

No Brasil, os estudos baseados no diagnós
tico de neurocisticercose comprovados por autópsia mos
tram uma incidência de 0,12 a 1,10% em hospitais gerais e
0,4 a 3,6% em hospitais neuropsiquiátricos (CANELAS, 1962).

A partir de 1925, levantamentos estatísti
cos sucessivos foram realizados em pacientes atendidos na
Clínica Neurológica da Faculdade de Medicina da Universi
dade de São Paulo. Lange (1940), de 1925 a 1940 reuniu
13 casos de neurocisticercose de 4200 pacientes atendi
dos (0,31%); Broto (1947), até 1946, 45 casos de 12361
pacientes (0,36%); Spina-França (1956), de 1947 a 1955 ,

66 casos de 2273 pacientes internados, com um percentual médio anual de 2,97% e Canelas (1962) registrou, de 1945 a 1961, 276 casos, representando 3,39% das internações.

Takayanagui & Jardim. (1983) reuniram 500 casos de neurocisticercose, de pacientes atendidos de 1956 a 1979, pela Disciplina de Neurologia do Departamento de Neuropsiquiatria e Psicologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Neste período, a neurocisticercose representou 2,7% dos atendimentos efetuados pela Disciplina de Neurologia e 7,5% das internações na enfermaria de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os índices da incidência de neurocisticercose encontrados, embora nem sempre possam ser comparados, devido à procedência da amostra e à metodologia empregada para caracterizar a doença, refletem a gravidade do problema em nosso meio.

Na grande maioria dos casos o prognóstico da neurocisticercose é desfavorável e, até o presente momento, não existe tratamento completamente eficaz. Desta forma, o diagnóstico da neurocisticercose deve apoiar-se em dados clínicos e laboratoriais de confiança.

Weinberg, em 1909, utilizando um extrato alcoólico de cisticercos, como antígeno, e soros de porcos infectados, foi o primeiro a empregar a reação de fixação de complemento para o diagnóstico laboratorial da cisticercose. Entretanto, utilizando esta técnica, ele

não conseguiu demonstrar a presença de anticorpos específicos no soro de pacientes com cisticercose. Moses, em 1911, demonstrou pela primeira vez a presença de anticorpos nos soros de três pacientes com cisticercose e no LCR de um deles, através da reação de fixação de complemento utilizando um extrato aquoso de cisticercos (NIETO, 1982).

Grund, em 1913, salientou a presença de eosinófilos no LCR, num paciente em cuja autópsia foi verificada a presença de cisticercos no SNC (NIETO, 1982).

Guilain, Péron e Thévenard, em 1926, descreveram dois casos de neurocisticercose em que o diagnóstico foi sugerido pelo exame do LCR. Em ambos havia hipertensão, pleocitose linfomonocitária, com presença de eosinófilos em um deles, hiperalbuminose, reação do benjoim coloidal com desvio para a esquerda e reação de Wassermann não reagente.

Vários autores passaram, então, a salientar a presença destes achados no LCR, em casos de neurocisticercose estudados em várias regiões do mundo.

Lange, em 1940, introduziu e conceituou a expressão "síndrome líquórica da cisticercose encefalomeníngea". Estudando as alterações do LCR em 24 casos de cisticercose encefálica o autor chegou às seguintes conclusões:

a) A pressão do LCR, hipercitose, hiperalbuminose e hiperglobulinemia não forneciam elementos

suficientes para o diagnóstico de cisticercose encefálica;

b) A floculação coloidal tipo parenquimato-
sa aliada à reação de Wassermann não reagente, constituíam
elementos de probabilidade;

c) A presença de eosinófilos era um ótimo
elemento para orientar o diagnóstico;

d) A reação de Weinberg, com extrato alco-
ólico de Cysticercus cellulosae, era o único elemento de
certeza, embora nem sempre fosse reagente.

Até 1940, a reação de fixação de complemen-
to e a reação de precipitação em tubos, introduzida em
1935 por Rothfeld (citado por BIAGI & TAY, 1958), eram os
únicos testes sorológicos usados para o diagnóstico de
cisticercose.

Em 1958, Biagi e Tay fizeram 22 preparações
antigênicas a partir de cisticercos total, escolêx, membra-
na e fluido vesicular. Empregando a reação de precipita-
ção em tubos, através de estudos de sensibilidade e espe-
cificidade, selecionaram uma preparação obtida de cisti-
cercos total. Utilizando esta preparação, em 1043 amostras
de LCR não selecionadas encontraram uma reagente, e esta
pertencia a uma criança com história clínica compatível com
neurocisticercose. Entre as amostras de LCR não reagen-
tes havia três de pacientes com calcificações intracrania-
nas, similares àquelas produzidas por cisticercos calcifi-
cados. Três amostras de LCR de pacientes com cisticercose,
comprovada por cirurgia ou autópsia, foram reagentes.

Em 1964, Biagi e Pinhã introduziram a reação de imunofluorescência indireta. Utilizando secções histológicas de Cysticercus cellulosae e soros de porcos naturalmente infectados, mostraram que a fluorescência - mais intensa aparecia nos corpúsculos calcáreos. Fluorescência menos intensa era observada na membrana e em outros lugares do escolêx e nenhuma na cutícula.

Em 1966, Proctor, Powell e Elsdon-Dew, utilizaram a reação de hemaglutinação passiva, empregando na sensibilização das hemácias, uma preparação antigênica obtida a partir do cisticerco total. A reação foi positiva em 85% dos soros humanos de pacientes com cisticercose - comprovada radiologicamente ou por autópsia.

Em 1971, Petithory, Jay e Feillet introduziram a técnica de imunoeletroforese para o diagnóstico laboratorial da cisticercose.

Em 1975, Flisser et alii, utilizando soros de indivíduos com diferentes probabilidades de terem cisticercose e 3 preparações antigênicas obtidas a partir de escolêx, parede e líquido vesicular, mostraram que a imunoeletroforese foi capaz de distinguir 25 antígenos: 11 no escolêx, 9 na parede e 5 no líquido vesicular. Alguns antígenos estavam presentes nas três preparações enquanto outros pareciam ser específicos de cada preparação. A menor quantidade de resultados falso-positivos, foi encontrada usando a preparação de parede, seguida pelas preparações de escolêx e líquido vesicular. A menor quantidade de resultados falso-negativos foi encontrada usando a

preparação de escolēx, seguida pelas preparações de líquido vesicular e parede.

Em 1980, Flisser, Woodhouse e Larraalde , usando um extrato bruto de Cysticercus cellulosae e soros de pacientes com neurocisticercose, mostraram, utilizando imunoeletroforese, que aproximadamente 50% dos pacientes não possuíam anticorpos circulantes, em concentrações suficientemente altas para precipitar com antígenos de cisticerco. Por outro lado, no grupo de pacientes que produziam anticorpos precipitantes, a resposta foi bastante heterogênea, com relação ao número e tipo de antígenos reconhecidos.

Em 1978, Arambulo III et alii, introduzi - ram a técnica ELISA ("enzyme-linked immunospecific assay") . Soros de pacientes com suspeita de cisticercose foram testados por hemaglutinação passiva e ELISA. Das 49 amostras testadas, 36 (73,47%) deram resultados positivos com hemaglutinação passiva e 38 (77,55%) com ELISA. A diferença não foi significativa e a concordância foi da ordem de 95,56%).

Praticamente, todos os testes sorológicos convencionais tem sido usados na pesquisa de anticorpos anti-cisticerco.

A seleção de um teste imunológico, para fins de pesquisa ou diagnótico, depende de uma combinação de variáveis: reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade, quantidade de informações fornecidas, custo e

facilidade de execução.

Antígenos e anticorpos marcados com enzimas, fluorocromos e radioisótopos tem sido, de modo geral, usados para a detecção, localização e quantificação de constituintes humorais e celulares.

Guesdson & Avrameas (1980, 1983) com base nas propriedades das lectinas, prepararam conjugados lectina-anticorpo, através de ligações covalentes e desenvolveram técnicas para a quantificação e titulação de antígenos e anticorpos. Na titulação de um soro, após a reação antígeno-anticorpo, é adicionado conjugado dissolvido em meio contendo um excesso do açúcar específico para a lectina usada. Deste modo, os sítios combinatórios das moléculas de anticorpo do conjugado reagem com os anticorpos do paciente, enquanto que os sítios livres da lectina, devido ao excesso de açúcar, não são capazes de reagir com porções de carboidratos presentes no meio ou na preparação antigênica. Após lavagem, para eliminar o excesso de açúcar e conjugado, um marcador possuindo porções de carboidratos capazes de interagir especificamente com a lectina é adicionado.

Os procedimentos baseados no uso de conjugados lectina-anticorpo são conhecidos como "lectin-immuno-test" (LIT). Vários marcadores, tais como enzimas, eritrócitos e substâncias marcadas com compostos radioativos, podem ser utilizados, de modo que as técnicas são conhecidas, respectivamente, por ENZY-LIT, ERYTHRO-LIT e RADIO-LIT.

Ao pesquisarmos a bibliografia referente referente à neurocisticercose, verificamos que, na grande maioria

dos trabalhos, a resposta humoral foi avaliada por reações de fixação de complemento.

Com a introdução da técnica ELISA, para o diagnóstico de cisticercose (ARAMBULO III et alii, 1978), esta vem sendo cada vez mais utilizada, principalmente em pesquisa médica e veterinária.

Guesdson e Avrameas (1980, 1983), ressaltam a simplicidade de execução, o baixo custo e a alta sensibilidade da técnica ERYTHRO-LIT. Sugerem que este procedimento poderia ser uma alternativa atraente para os testes diagnósticos de rotina e pesquisa convencionais. Diante disto, nos pareceu de interesse, pesquisar anticorpos anti-cisticerco em LCR de pacientes com neurocisticercose, usando conjugados lectina-anticorpo, principalmente através da técnica ERYTHRO-LIT, e comparar os resultados com aqueles obtidos com as técnicas convencionais de fixação de complemento e imunofluorescência indireta.

É sabido, há bastante tempo, que as várias espécies de helmintos possuem determinantes antigênicos similares, e isto se reflete na inespecificidade das reações imunológicas (BIGUET et alii, 1962).

Com respeito à pesquisa de anticorpos anti-cisticerco, no LCR há uma segurança diagnóstica que resulta da frequência pequena com que o SNC, no nosso meio, é parasitado por outros cestóides. O mesmo já não ocorre com a pesquisa de anticorpos no sangue, que tem um valor mais limitado (LIVRAMENTO, 1980).

Vários autores tem salientado a dificuldade de no diagnóstico diferencial entre neurolues e neurocisticercose, sendo frequente o aparecimento de reações cruzadas (WILLIAMS, 1948; REIS, BEI & DINIZ, 1949; COSTA et alii, 1982). Diante disto, nos pareceu de interesse verificar em amostras de LCR e soro de pacientes com lues, usando a técnica ERYTHRO-LIT, a presença de anticorpos capazes de reconhecer componentes antigênicos no extrato bruto de cisticercos.

A grande maioria das preparações antigênicas usadas nos testes para diagnóstico de cisticercose, são extratos brutos de cisticercos, variando, portanto, nas concentrações de antígenos e, conseqüentemente, na capacidade de reagir com anticorpos (FLISSER, PEREZ-MONFORT & LARRALDE, 1979). Além disso, essas preparações podem estar contaminadas com materiais do hospedeiro (WILLMS & ARCOS, 1977), podendo levar a resultados falso-positivos.

Kwa & Liew (1977), purificaram de um extrato bruto de cisticercos de Taenia taeniaeformis, através de filtração em Sephadex G-200, um antígeno capaz de conferir proteção em ratos contra a infecção por Taenia taeniaeformis. O perfil de eluição em Sephadex G-200, revelou 2 picos distintos, e entre os mesmos vários picos menores. O antígeno capaz de conferir proteção era encontrado no primeiro pico.

Diante disto, nos pareceu de interesse fracionar o extrato bruto de cisticercos, através da filtração em Sephadex G-200, com o intuito de encontrar alguma

fração que pudesse substituí-lo com vantagens.

II - OBJETIVOS

1. Utilização da técnica ERYTHRO-LIT no diagnóstico laboratorial da neurocisticercose. A aplicação desta técnica, baseada no uso de conjugados lectina - anticorpo, se justifica devido à sua sensibilidade, reprodutibilidade, facilidade de execução e pela possibilidade de preparação dos conjugados após a purificação da aglutinina de germe de trigo e do anticorpo.

2. Comparação dos resultados obtidos, em termos de título de anticorpos contra Cysticercus cellulosae, em LCR de pacientes com neurocisticercose, utilizando as técnicas ERYTHRO-LIT e ENZY-LIT. Esta é uma técnica imunoenzimática, baseada na utilização de conjugados contendo lectinas com afinidade para enzimas.

3. Comparação dos resultados obtidos em termos de título de anticorpos contra Cysticercus cellulosae, em LCR e soro de pacientes com neurocisticercose, utilizando a técnica ERYTHRO-LIT e as técnicas convencionais de fixação de complemento e imunofluorescência indireta.

4. Verificação da presença, em LCR e soro de pacientes com lues, utilizando a técnica ERYTHRO-LIT, de anticorpos capazes de reconhecer componentes do extrato

bruto de cisticercos.

5. Fracionamento do extrato bruto de cisticercos, através de filtração em Sephadex G-200, na tentativa de encontrar alguma fração que o substituísse com vantagens.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1. Reagentes usados

Acetato de sódio, acetona, ácido acético glacial, ácido bórico, ácido clorídrico, ácido dietil barbitúrico, azul de Evans, barbital sódico, bicarbonato de sódio, n-butanol, carbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, etanol, éter, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, gelatina, glicerina, hidróxido de sódio, sulfato de amônio, sulfato de cobre, tartarato de sódio, tetraborato de sódio, uréia (E. Merck, Darmstadt); reagente de fenol, segundo Folin-Ciocalteu (QUEEL - Indústrias Químicas S.A., São Paulo, Brasil); o-fenilenodiamina (ABBOTT Laboratories, Chicago, USA); Tri-(hidroximetil)-aminometano (Fisher Scientific Company, New Jersey, USA); glicina (Bio - Rad Laboratories, California, USA); N-acetil-D-glucosamina, concanavalina A - tipo V, CM-celulose, DEAE-celulose, α -D-manosídeo de metila-grau III, glutaraldeído-grau II, peroxidase tipo VI, Sephadex G-200, tween 20 (Sigma Chemical Company, Saint Louis, USA); agarose L, antígeno para a reação V.D.R.L. (Instituto Behring, W. Germany);

antígeno cardiolipídico, anti gama-globulina total humana marcada com fluoresceína (Biolab-Merieux, France); antígeno para reação de fixação de complemento para cisticercose (Lio Serum, Ribeirão Preto, Brasil); hemolisina (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil); Ponceau S (Fluka, AG, Buchs SG, Switzerland); soro de burro anti-soro humano total (gentilmente cedido pelo Dr. Ivan Mota, Instituto Butantan, Brasil).

2. Amostras de LCR e soro

As amostras de LCR e soro foram obtidas de pacientes atendidos pelo Centro de Investigações em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pelo Departamento de Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As amostras foram obtidas dos seguintes grupos de pacientes:

Grupo I. Pacientes com diagnóstico comprovado de neurocisticercose.

O diagnóstico foi baseado em critérios epidemiológicos, exame clínico e neurológico, exame do LCR e/ou tomografia computadorizada.

(34 amostras de LCR de 27 pacientes; 19 amostras de soro de 14 pacientes)

- Grupo II. Pacientes com diagnóstico de neurolues, com reações de fixação de complemento (reação de Wassermann) e/ou reações de imunofluorescência indireta (FTA-Abs) reagentes.
(11 amostras de 8 pacientes)
- Grupo III. Pacientes com diagnóstico de lues, com reações de fixação de complemento e V.D.R.L. reagentes.
(11 amostras de 9 pacientes).
- Grupo IV. Pacientes com cefaléia crônica, sem dados clínicos e epidemiológicos afirmativos para neurocisticercose e com exame neurológico, eletroencefalograma e análise laboratorial do LCR normais.
(10 amostras de 10 pacientes)
- Grupo V. Pacientes não selecionados, cujos dados clínicos sã foram conhecidos após a realização das reações imunológicas.
(45 amostras de LCR e soro de 45 pacientes)

Foram também obtidas 15 amostras de soro de 15 indivíduos aparentemente normais, alunos do 4º ano da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

3. Preparação de extrato bruto de cisticercos

As vesículas de cisticercos foram retiradas cuidadosamente da carne de porco, colocadas num recipiente,

e lavadas extensivamente com solução salina gelada. O fluido vesicular foi retirado, com o auxílio de papel de filtro (Whatman 1), pela compressão suave das vesículas, e os parasitas, em grupos de 50, colocados em recipiente contendo 100 ml de acetona gelada. O material foi deixado, a 4°C sob agitação periódica, durante 10 minutos, e a seguir centrifugado, à mesma temperatura, a 800.g durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante, retirado cuidadosamente, foi desprezado e os tubos de centrifuga foram colocados em dissecador com vácuo, a 4°C. Depois de seco, o material foi reduzido a pó, com o auxílio de moedor e pistilo. Para cada 500 mg de pó foram adicionados 10 ml de tampão fosfato de sódio 0,01M, pH = 7,2/NaCl 0,15M, e a mistura foi homogeneizada, com 3 movimentos verticais completos, em homogeneizador Potter-Elvehjen. O material foi deixado durante 15 horas, a 4°C, sob agitação contínua, à baixa velocidade e, a seguir centrifugado a 25000.g, durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante (extrato bruto de cisticercos) foi separado, aliquotado e estocado a -80°C, até o momento de uso.

4. Obtenção da IgG humana

A IgG humana foi obtida, por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, a partir da fração globulina de um "pool" de soros humanos normais, de acordo com a técnica descrita por Vaerman, Heremans & Vaerman (1963).

A fração globulina foi obtida, através de precipitação com sulfato de amônio, de acordo com a técnica descrita por Garvey, Cremer & Susdorf (1977).

a) Precipitação com sulfato de amônio

A fração globulina, de um "pool" de soros humanos normais, foi precipitada, à temperatura ambiente, com uma solução saturada de sulfato de amônio, previamente ajustada para pH=7,8 com uma solução de NaOH 2N. Para cada 10ml do "pool" de soros foram adicionados, sob agitação contínua, gota a gota, 5 ml da solução de sulfato de amônio. A mistura foi deixada sob agitação contínua durante 1 hora e, a seguir, centrifugada, à temperatura ambiente, a 1800.g durante 30 minutos. O precipitado foi dissolvido em NaCl 0,15 M, de modo a reconstituir o volume original, e dialisado, a 4°C, contra tampão fosfato de sódio 0,01 M pH=8, até ficar isento de íons sulfato.

a) Cromatografia em DEAE-celulose

Foi preparada uma papa de DEAE-celulose misturando 20 g de resina com 500 ml de água destilada. Após homogeneização a mistura foi deixada 1 hora à temperatura ambiente. Findo este intervalo, o sobrenadante foi removido por decantação e a resina ressuspensa em 1 litro de uma solução de NaOH 0,5 N e deixada 30 minutos à temperatura ambiente com agitação ocasional. O fluido foi, então, removido por sucção, com o auxílio de funil de Büchner, e a resina lavada extensivamente com água destilada, sendo então equilibrada com tampão fosfato de sódio a 0,01M pH=8.

Aliquotas de 2 ml da fração globulina foram aplicadas às colunas de 1,4x13 cm. A eluição foi processada, a 4°C, com o tampão de equilíbrio, a uma velocidade de fluxo de 6 ml/hora. O efluente foi recolhido em frações de 2 ml por tubo, sendo sua absorvância determinada a 280 nm (espectrofotômetro BAUSCH&LOMB).

O material foi dialisado contra NaCl 0,15M, a 4°C, durante 48 h sendo a seguir concentrado por ultrafiltração, sob pressão de nitrogênio, através de membranas que retêm moléculas de peso molecular maior que 10000 (PM - 10 - Diaflo Membranes).

Após determinação da concentração proteica, o material foi submetido à imunoeletroforese, para avaliar a sua pureza e estocado a - 80°C até o momento do uso.

5. Obtenção da anti-IgG humana

A anti-IgG humana foi obtida, a partir de soro de burro anti-soro humano total, por cromatografia de afinidade, usando IgG humana acoplada a Sepharose 4B como adsorvente, de acordo com a metodologia descrita por Garvey, Cremer & Susdorf (1977).

A Sepharose 4B ativada foi preparada re constituindo 2 g da mesma em 25 ml de água destilada e la vando rapidamente o gel com 200 ml de água destilada. Ime diatamente após a lavagem, o gel foi transferido para um

recipiente contendo 33 mg de IgG humana, dissolvida em 10 ml de tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH=9,7, preparado em NaCl 0,5M. A mistura foi deixada, à temperatura ambiente, sob agitação constante, à baixa velocidade, durante 2 horas, e em seguida, deixada em repouso, durante 20 horas, a 4°C, temperatura esta, em que foram realizados todos os passos seguintes.

Após incubação com IgG humana o gel foi lavado com 250 ml de solução salina tamponada com borato 0,15M pH=8,4 (STB) e o efluente foi coletado para a determinação da concentração de proteínas. O gel foi, então, lavado, sucessivamente, com 50 ml de cada uma das seguintes soluções, preparadas em NaCl 0,5M: tampão acetato 0,1M pH=4,5, uréia 2M e tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH=9,7. Este ciclo de lavagens foi repetido por mais duas vezes.

O gel foi transferido para uma coluna de 2,5 x 6 cm e lavado com 100 ml de STB, sendo o fluxo da coluna interrompido quando o tampão cobria superficialmente o gel. Foram, então, adicionados 100 ml de uma solução de glicina - HCl 0,2M pH=2,3, que foi deixada em contato com o gel, com agitação ocasional, durante 15 minutos. O gel foi, então, lavado com 200 ml de STB e o fluxo da coluna interrompido, como já descrito.

Soro de burro anti-soro humano total foi diluído a 1:2 com STB e uma alíquota de 5 ml foi aplicada à coluna. O material foi deixado em contato com o gel, com agitação ocasional, durante 15 minutos. O fluxo da

coluna foi então normalizado e após a passagem do material não retido no gel, este foi lavado com 200 ml de STB, para remover o material absorvido não especificamente. Após a lavagem com STB, o fluxo da coluna foi interrompido, como já descrito, e 10 ml de uma solução de glicina-HCl 0,2M pH=2,3 foi adicionada à coluna e deixada em contato com o gel, com agitação ocasional, durante 15 minutos. O fluxo da coluna foi então normalizado e o efluente, contendo os anticorpos anti-IgG, coletado. Ao mesmo tempo que o material era coletado, foram adicionados à coluna mais 10 ml da solução glicina-HCl seguida de 60 ml de STB, de modo a se obter um efluente com volume final de aproximadamente 80 ml.

O efluente foi dialisado durante 48 h, a 4º C, contra STB, e concentrado por ultrafiltração como já descrito.

Após determinação da concentração proteica, o material foi submetido à imunoelctroforese, para avaliar a sua pureza e estocado a - 80º C, até o momento do uso.

6. Isolamento e purificação da aglutinina de germe de trigo (WGA).

O isolamento e a purificação da WGA foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Nagata & Burger (1972) e Nagata, Goldberg & Burger (1974).

a) Preparação do extrato bruto da WGA.

Germe de trigo foi triturado, com o auxílio de moedor e pistilo, de modo a se obter um pó fino, e 150 g foram transferidas para um recipiente contendo 1 litro de acetona, previamente resfriada com o auxílio de gelo seco. A mistura foi deixada 30 minutos, a 4°C, com agitação periódica, e então filtrada através de papel de filtro em funil de Büchner. O material retido no papel de filtro foi lavado com 1 1/2 litro de acetona gelada, transferido para placas de Petri onde foi deixado secar, à temperatura ambiente. O material foi então transferido para um recipiente contendo 1 litro de HCl 0,05N e a mistura foi deixada 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação constante, à baixa velocidade e a seguir centrifugada, a 4°C, a 2000.g durante 20 minutos. Ao sobrenadante, a 4°C, foi adicionado, lentamente, sulfato de amônio, de modo a se obter 35% de saturação. Após a adição do sal, o material foi deixado durante 1 hora, a 4°C, sob agitação constante, à baixa velocidade. A seguir o material foi centrifugado a 12000.g, a 4°C, durante 15 minutos e o precipitado, contendo a aglutinina, ressuspenso em 200 ml de HCl 0,05N. O material foi centrifugado a 15000.g, a 4°C, durante 20 minutos, para remoção do material insolúvel, e ao sobrenadante, à temperatura ambiente, foi adicionado, sob agitação constante, n-butanol, gota a gota, de modo a se obter uma concentração final de 20% (V/V). O material foi deixado sob agitação constante, à baixa velocidade, durante 1 hora e a seguir centrifugado a 5000.g durante 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação a fase superior e a

interfase foram removidas por sucção e a fase aquosa clara inferior foi dialisada contra HCl 0,05N a 40C, durante 48 horas. Após a diálise, ao material foi adicionado lentamente sulfato de amônio, como já descrito. Após a adição do sal o material foi deixado sob agitação constante, à baixa velocidade, durante 1 hora, a 40 C, e, a seguir, centrifugado a 12000.g, a 40C, durante 15 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 20 ml de HCl 0,05N, dialisado extensivamente contra tampão Tris-HCl 0,01M pH=8,5 e submetido à cromatografia em DEAE-celulose.

b) Cromatografia em DEAE-celulose

A resina foi preparada como já descrito e equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01M pH=8,5.

Uma alíquota de 10 ml do extrato bruto da aglutinina, contendo 21 mg de proteína/ml, foi aplicada à uma coluna de 2,1 x 39cm. A eluição foi processada, a 40C, com o tampão de equilíbrio, à uma velocidade de fluxo de 18 ml/hora. O efluente foi recolhido em frações de 5 ml por tubo, sendo sua absorvância determinada a 280 nm (espectrofotômetro BAUSCH & LOMB). As frações com atividade hemaglutinante foram reunidas e o material foi dialisado contra água destilada, liofilizado e estocado em freezer a -800C.

c) Cromatografia em CM-celulose.

Foi preparada uma papa de CM-celulose,

misturando 30 g de resina com 500 ml de uma solução contendo volumes iguais de NaCl 0,5M e NaOH 0,5M, e após homogeneização o fluido foi removido por sucção através de funil de Büchner. A resina foi novamente ressuspendida na solução de NaCl + NaOH e a operação anterior repetida 2 vezes. A celulose foi, a seguir, lavada extensivamente com água destilada, sendo então equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,001M pH=6.

O material liofilizado, obtido na cromatografia em DEAE-celulose, foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,001M pH=6 e dialisado contra esse mesmo tampão 12 horas, a 4°C. Após centrifugação a 800.g, durante 15 minutos, a 4°C, para remoção de substâncias insolúveis, uma alíquota de 10 ml, contendo 4 mg de proteína/ml, foi aplicada a uma coluna de 1,4 x 15 cm.

A eluição foi processada por etapas ("step-wise"), a 4°C, a uma velocidade de fluxo de 30 ml/hora, com tampão fosfato de sódio 0,001M pH=6, tampão fosfato de sódio 0,001M pH=6 contendo 0,08M de NaCl e tampão fosfato de sódio 0,001M pH=6 contendo 0,35M de NaCl. O efluente foi recolhido em frações de 3 ml por tubo, sendo sua absorbância determinada a 280 nm (espectrófotômetro BAUSCH & LOMB).

As frações com atividade hemaglutinante foram reunidas e material foi dialisado contra água destilada, a 4°C, durante 48 horas. O material foi, então, liofilizado e estocado em "freezer" a -80°C, até o momento do uso.

d) Análise da atividade hemaglutinante.

A atividade hemaglutinante das frações, obtidas nas cromatografias em DEAE e CM-celulose, foi analisada por reação de aglutinação em lâmina.

Em lâminas de vidro (5 x 10cm) foram depositados, lado a lado, 20 μ l de cada uma das frações e 20 μ l de uma suspensão de hemácias de carneiro, contendo 2×10^6 células/ml, em tampão fosfato de sódio 0,01M pH=7,2/NaCl 0,15M, previamente lavadas 10 vezes com essa mesma solução. Os materiais foram misturados com o auxílio de um pequeno bastão e a lâmina foi submetida a um leve movimento de rotação durante 1 minuto. A lâmina foi, então, colocada sobre uma superfície plana e foi observado, a olho nu, no decorrer de 3 minutos, o aparecimento, ou não, de aglutinação.

7. Fracionamento do extrato bruto de cisticercos através de cromatografia em Sephadex G-200

Foi preparada uma papa de Sephadex G-200 adicionando lentamente, com agitação suave, 8 g de resina a 2 litros de tampão fosfato de sódio 0,01M/NaCl 0,15M, pH=7,2 (STF) e a mistura foi deixada, em repouso, durante 3 horas, à temperatura ambiente. Findo esse intervalo de tempo, o sobrenadante foi removido por decantação, o gel ressuspenso novamente em STF e o material foi deixado, à temperatura ambiente, durante 4 dias, com trocas periódicas do tampão.

Uma alíquota de 2,5 ml do extrato bruto de cisticercos, contendo 4,5 mg de proteína/ml, previamente dialisada contra STF, foi aplicada a uma coluna de 2,1 x 98,5cm. A eluição foi processada, a 4°C, com o tampão de equilíbrio, a uma velocidade de fluxo de 8ml/hora. O efluente foi recolhido em frações de 1,2 ml/tubo, sendo sua absorvância determinada a 280 nm (espectrofotômetro - BAUSCH & LOMB).

As frações obtidas foram concentradas por ultrafiltração, como já descrito, e estocadas em "freezer" a - 80°C até o momento do uso.

8. Imunoeletroforese

Lâminas de vidro (26 x 76 mm) foram recobertas com 4 ml de agarose a 1% em tampão barbital 0,05M pH=8.2. Esse mesmo tampão foi usado na eletroforese, que foi realizada com uma corrente contínua de 150V, durante 45 minutos (Fonte BOSKAMP-Pherostat, West Germany).

Após a aplicação do anti-soro específico as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida, a 4°C, durante 48 horas. Findo esse intervalo de tempo, as lâminas foram colocadas em placas de Petri contendo NaCl 0,15M, onde permaneceram 48 horas, a 4°C, com várias trocas da solução salina. As lâminas foram, então, recobertas com papel de filtro, saturado com água destilada, e acondicionadas - em estufa, a 37°C, durante 24 horas. Findo esse intervalo de tempo, o papel de filtro foi removido e as lâminas foram coradas com Ponceau S.

9. Dosagem de proteínas

As dosagens de proteína foram realizadas pelo método de Lowry (GARVEY, CREMER & SUSSDORF, 1977).

10. Hemácias de carneiro

Sangue de carneiro foi coletado, de maneira estéril, em frasco contendo solução de Alsever, volume a volume, e deixado a 4°C durante 4 dias antes do uso.

Para a técnica ERYTHRO-LIT as hemácias foram lavadas 10 vezes com tampão fosfato de sódio 0,01M, pH=7,4/NaCl 0,15M (PBS), utilizando centrifugação a 600.g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

Para a técnica de fixação de complemento as hemácias foram lavadas 4 vezes com solução salina tamponada com barbital, contendo cálcio e magnésio, 0,15M pH=7,3.

11. Absorção com hemácias de carneiro

Para a técnica ERYTHRO-LIT, LCR e soro foram aquecidos a 56°C durante 30 minutos. Para cada 1 ml de LCR ou soro foram adicionados 100 µl de papa de hemácias de carneiro e a mistura foi deixada durante 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação ocasional. Após centrifugação a 600.g, durante 15 minutos, a 4°C, os sobrenadantes foram separados e a operação anterior repetida. Após centrifugação, nas condições já descritas, os sobrenadantes foram separados, aliquotados e estocados em "freezer",

a - 80°C, até o momento do uso.

12. Preparação dos conjugados lectina: anticorpo

Os conjugados WGA: anti-IgG humana e conca navalina A (con A): anti-IgG humana foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Guesdon & Avrameas (1980, 1983).

As lectinas e os anticorpos isolados foram dialisados contra tampão fosfato 0,1M pH=6,8 (TF) durante 18 horas a 4°C. A seguir, 4 mg da lectina foram misturadas com 2 mg de anticorpos, em um volume final de 0,9ml. À mistura foi adicionado 0,1 ml de uma solução a 1M, em TF, do açúcar específico da lectina, N-acetil-D-glucosamina - (WGA) ou α -D-manosídeo de metila (con A). Enquanto a mistura era agitada suavemente, foram adicionados 20 μ l de uma solução de glutaraldeído a 1% em água destilada. Após incubação por 3 horas, à temperatura ambiente, foram adicionados 50 μ l de uma solução de glicina 2M em água destilada. Após 2 horas de incubação, à temperatura ambiente, a mistura foi dialisada, durante 18 horas, a 4°C, contra tampão fosfato 0,01M, pH=7,4/NaCl 0,15M (PBS) e a seguir centrifugada a 3000.g durante 30 minutos a 4°C. Ao sobrenadante, separado cuidadosamente, foi adicionado um volume de glicerina e a preparação foi mantida em "freezer" a - 20°C, até o momento do uso.

13. Revestimento dos orifícios de placas de poliestireno com antígeno

Aos orifícios de placas de poliestireno com fundo em U (Interlab, São Paulo, Brasil) foram adicionados 150 µl de tampão carbonato 0,1M pH=9,5, contendo 10µg de proteína/ml do extrato bruto de cisticercos ou das frações obtidas por cromatografia em Sephadex G-200. Após incubação por 2 horas a 37°C e 16 horas a 4°C, o material dos orifícios foi desprezado e os mesmos foram lavados 3 vezes com PBS contendo 0,1% de Tween 20 (PBS/T).

14. Titulação dos conjugados

Um "pool" de LCR reagentes foi diluído em PBS/T contendo 0,3% de gelatina (PBS/TG) e 150 µl das várias diluições foram adicionados aos orifícios da placa de poliestireno recobertos com o extrato bruto de cisticercos. Após incubação, por 16 horas, a 4°C, o material dos orifícios foi desprezado e os mesmos foram lavados 3 vezes com PBS/T. Os conjugados foram diluídos em PBS/TG contendo 0,1M do açúcar específico para a lectina (PBS/TGA) e 150 µl das várias diluições foram adicionados aos orifícios. Após incubação, por 2 horas, a 37°C, o material dos orifícios foi desprezado e os mesmos foram lavados, como já descrito.

Na titulação dos conjugados contendo WGA, foram adicionados aos orifícios 150 µl de uma suspensão de hemácias de carneiro a 0,04% em PBS. Após 3 horas de

incubação, à temperatura ambiente, o título do conjugado foi avaliado como sendo a diluição mais alta capaz de produzir uma eritroadSORÇÃO claramente definida.

Na titulação dos conjugados contendo con A, foram adicionados aos orifícios 150 μ l de uma solução de peroxidase a 10 μ g/ml em PBS/T. Após incubação por 3 horas a 37°C, o material dos orifícios foi desprezado e, após 3 lavagens com PBS/T, aos mesmos foram adicionados 150 μ l de uma solução de o-fenilenodiamina a 0,025% em tampão fosfato de sódio 0,01M pH=6, contendo 0,5 μ l/ml de H₂O₂ a 3%. Após incubação por 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, a reação foi bloqueada pela adição de 50 μ l de HCl 4N. As reações foram lidas a 492 nm, e o título do conjugado foi avaliado como sendo a diluição mais alta capaz de produzir uma reação positiva. A positividade das reações foi determinada de acordo com Wolters et alii (1976).

15. Pesquisa de anticorpos usando conjugados contendo lectinas

Aos orifícios das placas de poliestireno - recobertos com antígeno foram adicionados, em triplicata, 150 μ l de várias diluições de LCR ou soro em PBS/TG. Após incubação por 16 horas, a 4°C, o material dos orifícios foi desprezado e os mesmos foram lavados 3 vezes com PBS/T. Foram então adicionados aos orifícios 150 μ l do conjugado, diluído em PBS/TGA. Após incubação, por 2 horas, a 37°C, o material dos orifícios foi desprezado e

os mesmos foram lavados como já descrito.

Nas reações em que foram utilizados conjugados contendo WGA, foram adicionados aos orifícios 150 μ l de uma suspensão de hemácias de carneiro a 0,04% em PBS. Após incubação, durante 3 horas, à temperatura ambiente, o título de anticorpos foi avaliado como sendo a diluição mais alta capaz de produzir eritroadsorção claramente definida.

Nas reações em que foram utilizados conjugados contendo con A, foram adicionados aos orifícios 150 μ l de uma solução de peroxidase a 10 μ g/ml em PBS/T. Após incubação, por 3 horas, a 37°C, o material dos orifícios foi desprezado e, após 3 lavagens com PBS/T, aos mesmos foram adicionados 150 μ l de uma solução de o-fenilenodiamina a 0,025% em tampão fosfato de sódio a 0,01M pH=6, contendo 0,5 μ l/ml de H₂O₂ a 3%. Após 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, a reação foi bloqueada pela adição de 50 μ l de HCl 4N. As reações foram lidas a 492 nm, e o título de anticorpos foi avaliado como sendo a diluição mais alta capaz de produzir uma reação positiva. A positividade das reações foi determinada como já descrito.

16. Reação de fixação de complemento

As reações de fixação de complemento foram realizadas de acordo com a técnica de Kolmer, Spaulding & Robinson (1951), com pequenas modificações, relativas ao diluente e à concentração de hemácias. O diluente usado foi uma solução salina tamponada com barbital, contendo

cálcio e magnésio, 0,15M pH=7,3 (BBS). A suspensão de hemácias de carneiro foi padronizada de modo que uma diluição a 1:10 em água destilada fornecesse uma absorbância igual a $0,5 \pm 0,01$, a 545 nm (espectrofotômetro BAUSCH & LOMB).

Soros e LCR foram aquecidos a 56°C durante 30 minutos e os soros foram pré-diluídos a 1:5 com BBS. Em tubos de ensaio foram misturados 0,2 ml de várias diluições de LCR ou soro e 0,1 ml de antígeno, previamente titulado. Após incubação, por 10 minutos, à temperatura ambiente, foi adicionado 0,2 ml de uma diluição pré-determinada de soro de cobaia. A mistura foi deixada durante 16 horas a 40°C e em seguida 10 minutos a 37°C. Foi então adicionado 0,1 ml de hemolisina, previamente titulada, e 0,1 ml da suspensão de hemácias padronizadas. A mistura foi colocada a 37°C e, 10 minutos após a hemólise dos controles o título de anticorpos foi avaliado como sendo a maior diluição do LCR ou soro em que não ocorria hemólise total.

17. Reação de imunofluorescência indireta

As reações de imunofluorescência indireta para cisticercose foram realizadas de acordo com a técnica de Machado, Camargo & Hoshino (1973).

Em lâminas de microscopia, contendo fragmentos de Cysticercus cellulosae fixados, foram aplicados 10 µl de várias diluições de LCR ou soro, em solução

salina tamponada com fosfatos 0,15 M pH=7,2 (STF). Após incubação, por 30 minutos, em câmara úmida, a 37°C, as lâminas foram lavadas 3 vezes, através de imersão, durante 10 minutos, em cubas contendo STF. Após secagem, com o auxílio de jato de ar quente, foram aplicados, a cada diluição de LCR ou soro, 10 µl de anti-imunoglobulina total humana marcada com fluoresceína, previamente titulada e diluída em STF contendo 0,001% de azul de Evans. As lâminas foram deixadas em câmara úmida, a 37°C, durante 30 minutos, e a seguir lavadas e secas, como já descrito. As lâminas foram montadas, com o auxílio de glicerina tamponada, e observadas ao microscópio de fluorescência (microscópio Zeiss, West Germany). O título de anticorpos foi avaliado como sendo a maior diluição do LCR ou soro capaz de produzir reação fluorescente nítida.

IV - RESULTADOS

1. Obtenção da IgG humana

A IgG humana foi isolada, a partir da fração globulina de um "pool" de soros humanos normais, por cromatografia de troca iônica, em coluna de DEAE-celulose.

A figura 1 mostra o resultado da cromatografia em DEAE-celulose.

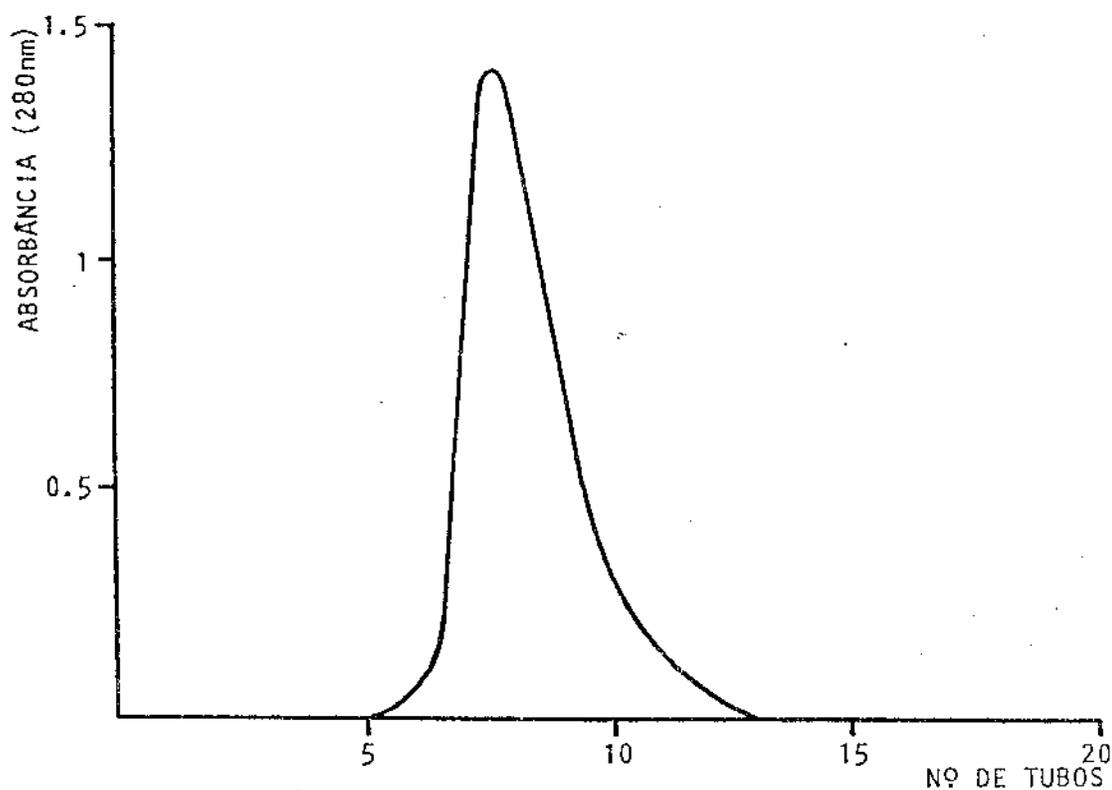


Figura 1. Cromatografia em DEAE-celulose da fração globulina de um "pool" de soros humanos normais. Aliquota de 2 ml da fração globulina foi aplicada à coluna (1,4 x 13 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01M pH=8. A eluição foi processada com o mesmo tampão a uma velocidade de fluxo de 6 ml/hora (2 ml/tubo).

Após a eluição foi obtido um único pico. As frações foram concentradas por ultrafiltração e sua pureza foi avaliada por imunoeletroforese.

O material foi submetido à eletroforese, nas condições descritas, e posteriormente revelado com soro de burro anti-soro humano total.



Figura 2. Imunoeletroforese de soro humano normal (orifício superior) e do material eluído em DEAE-celulose (orifício inferior). Os componentes foram separados por eletroforese e posteriormente revelados com soro de burro anti-soro humano total.

Como pode ser observado, a imunoeletroforese do material eluído em DEAE-celulose revela apenas um arco de precipitação, correspondente a IgG.

2. Obtenção da anti-IgG humana

Usando a IgG humana acoplada a Sepharose - 4B, como adsorvente, foi isolado, a partir de soro de burro anti-soro humano total, por cromatografia de afinidade, a fração anti-IgG, como já descrito. Nas condições utilizadas, foram isoladas 1,2 mg de anticorpos anti-IgG/ml de soro.

A fração anti-IgG, obtida por cromatografia de afinidade, foi concentrada e sua pureza avaliada por imunoeletroforese.

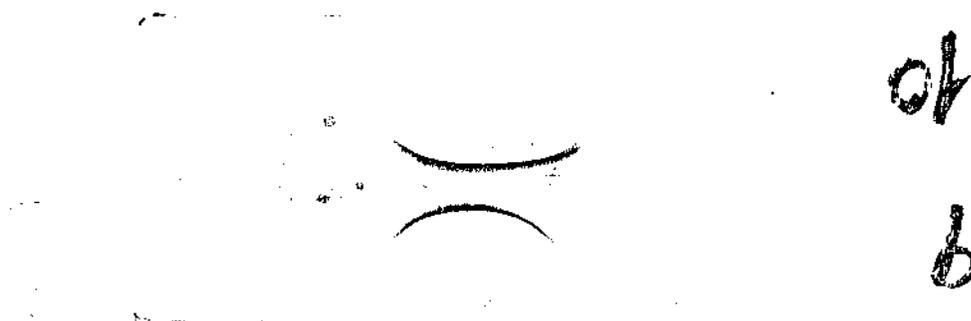


Figura 3. Imunoeletroforese de soro humano normal (orifício superior) e da IgG obtida através de cromatografia em DEAE - celulose (orifício inferior). Os componentes foram separados por eletroforese e posteriormente revelados com a fração anti-IgG obtida por cromatografia de afinidade.

Como pode ser observado, a fração anti-IgG, obtida por cromatografia de afinidade, revela no soro humano normal apenas um arco de precipitação, correspondente a IgG.

3. Purificação da WGA

A WGA foi purificada a partir de um extrato bruto da aglutinina, por cromatografias de troca iônica, em colunas de DEAE e CM-celulose.

A figura 4 mostra o resultado da cromatografia em DEAE - celulose.

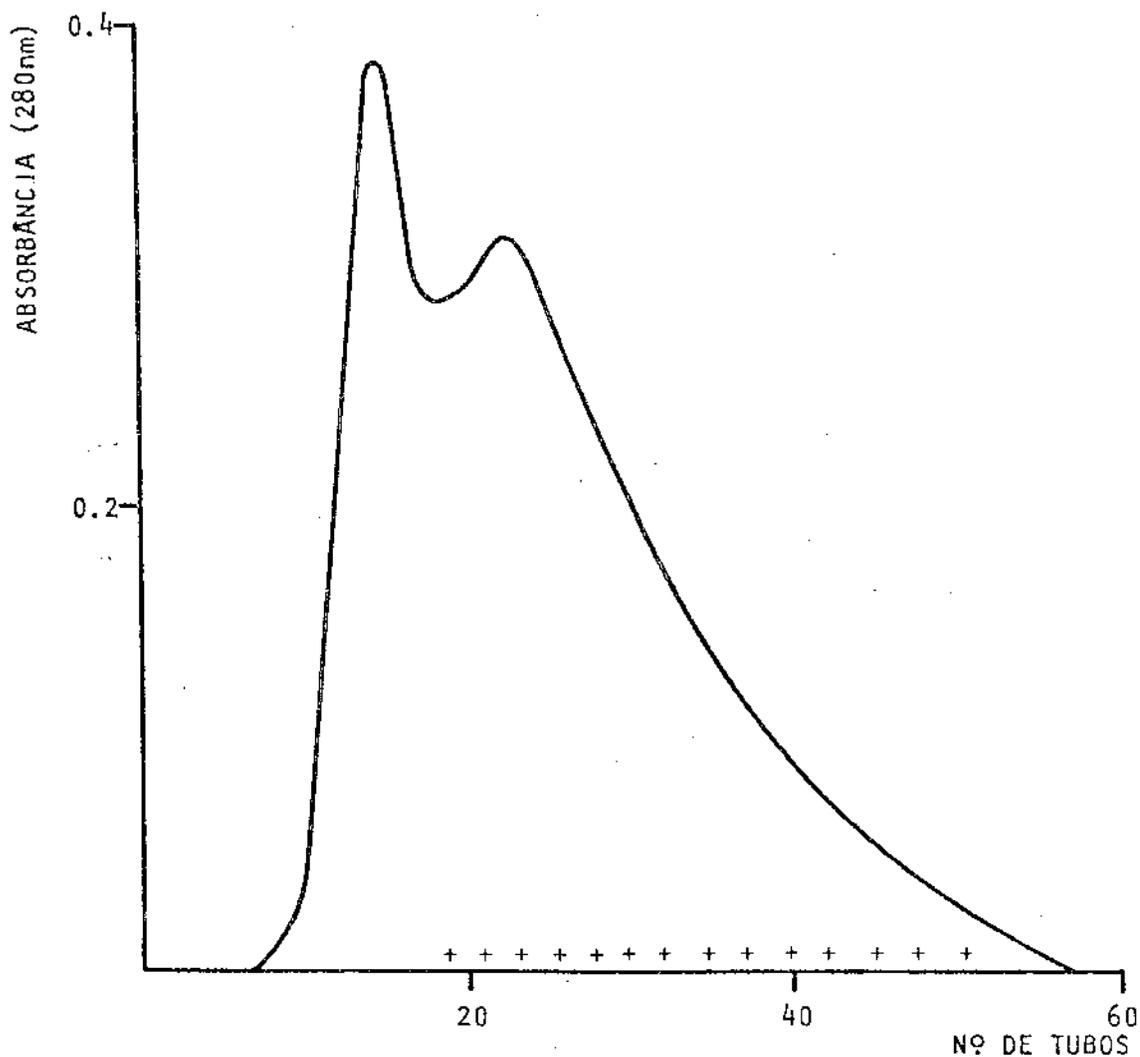


Figura 4. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose do extrato bruto da WGA. Aliquota de 10 ml do extrato bruto contendo 210 mg de proteína foi aplicada à coluna (2,1 x 39 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01M, pH=8,5. A eluição foi processada com o mesmo tampão, à uma velocidade de fluxo de 18ml/hora (5 ml/tubo). As cruzes no gráfico indicam as frações nas quais foi detectada atividade hemaglutinante.

As frações com atividade hemaglutinante, eluidas em DEAE-celulose, foram submetidas à cromatografia em CM-celulose, nas condições já descritas.

A figura 5 mostra o resultado da cromatografia em CM-celulose.

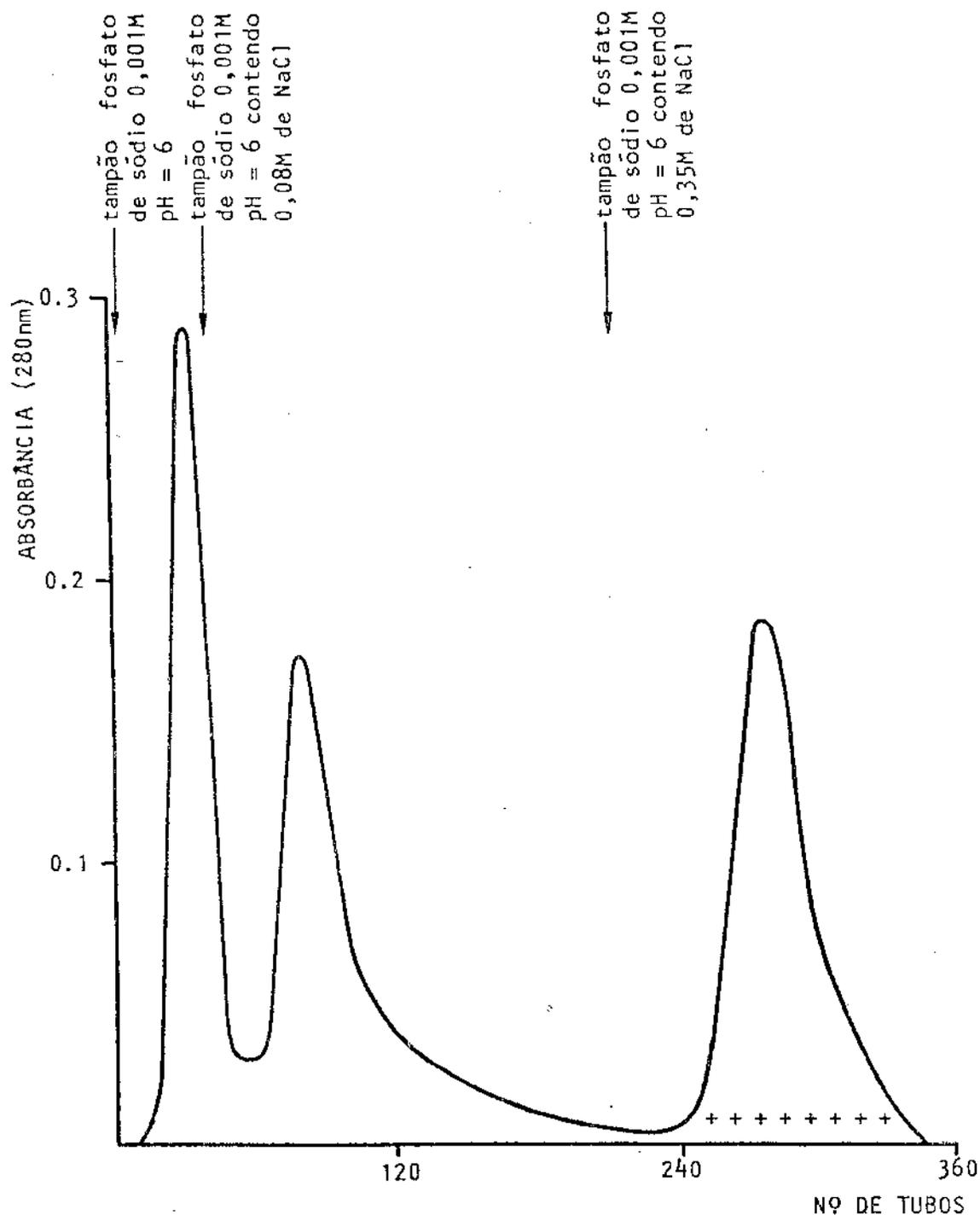


Figura 5. Cromatografia em CM-celulose das frações com atividade hema glutinante eluídas em DEAE-celulose. Aliquota de 10 ml do material com atividade hemaglutinante, contendo 40 mg de proteína, foi aplicada à coluna (1,4 x 15 cm) previamente e equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,001M pH=6. As frações foram eluídas por etapas ("step-wise") com tampão fosfato de sódio 0,001M pH=6, tampão fosfato de sódio 0,001M pH=6 contendo NaCl 0,08 e tampão fosfato de sódio 0,001M pH=6 contendo NaCl 0,35M, à uma velocidade de fluxo de 30 ml/hora (3 ml/tubo). As setas indicam a troca dos tampões de eluição. As cruzes indicam as frações nas quais foi detectada atividade hemaglutinante.

4. Detecção de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae, através das técnicas ERYTHRO-LIT e ENZY-LIT, em LCR de pacientes com neurocisticercose e em LCR de pacientes sem suspeita clínica de neurocisticercose.

O título de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae foi avaliado, através das técnicas ERYTHRO-LIT e ENZY-LIT , em 17 amostras de LCR de 12 pacientes com neurocisticercose, e os resultados estão expressos no quadro I.

Q U A D R O I

ANTICORPOS ANTI-CYSTICERCUS CELLULOSAE DETECTADOS POR
ERYTHRO-LIT E ENZY-LIT EM LCR DE PACIENTES COM NEUROCISTI
CERCOSE.

AMOSTRA DE LCR	TÍTULO DE ANTICORPOS	
	ERYTHRO LIT	ENZY LIT
1	1:4096	1:4096
2	1:1024	1:2048
3	1:1024	1:1024
4	1:4	1:2
5	1:256	1:128
6	1:1024	1:1024
7	1:256	1:128
8	1:2048	1:2048
9	1:32	1:64
10a	1:1024	1:512
10b	1:512	1:512
11a	1:512	1:256
11b	1:512	1:256
12a	1:256	1:256
12b	1:256	1:128
12c	1:256	1:128
12d	1:256	1:256

Várias diluições de LCR foram adicionadas aos orifícios de placas de poliestireno recobertos com extrato bruto de cisticercos. Após incubação, os orifícios foram lavados e, aos mesmos, foi adicionado conjugado. Após incubação e lavagem dos orifícios, nas placas em que foi utilizado conjugado contendo WGA, foi adicionado uma suspensão a 0,04 % de hemácias de carneiro, e após 3 horas de incubação, à temperatura ambiente, o título de anticorpos foi avaliado; nas placas em que foi utilizado conjugado contendo con A, foi adicionado uma solução de peroxidase. Após incubação e lavagem dos orifícios foi adicionado o substrato da enzima. Após incubação, a reação enzimática foi bloqueada e o título de anticorpos avaliado.

Como pode ser observado, não há uma diferença significativa, em termos de título de anticorpos, utilizando as 2 técnicas.

O título de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae foi também avaliado, através das técnicas ERYTHRO-LIT e ENZY-LIT, em 10 amostras de LCR de pacientes sem suspeita clínica de neurocisticercose.

Das amostras testadas, todas foram não reagentes, com a técnica ENZY-LIT e somente uma apresentou título 1:2 com a técnica ERYTHRO-LIT.

5. Comparação da técnica ERYTHRO-LIT com as técnicas de fixação de complemento e de imunofluorescência indireta.

Com o intuito de comparar os resultados obtidos com a técnica ERYTHRO-LIT, com aqueles obtidos pelas técnicas de fixação de complemento e imunofluorescência indireta, o título de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae foi avaliado em 34 amostras de LCR de 27 pacientes com neurocisticercose e os resultados estão expressos no quadro II e na figura 6.

QUADRO II

TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI-CYSTICERCUS CELLULOSAE DETECTADOS POR ERYTHRO-LIT, RFC E IFI EM LCR DE PACIENTES COM NEUROCI-TICERCULOSE.

AMOSTRA DE LCR	TÍTULO DE ANTICORPOS		
	ERYTHRO LIT	RFC	IFI
1	1:4096	1:64	1:32
2	1:1024	1:8	1:8
3	1:1024	1:16	1:16
4	1:4	NR	NR
5	1:256	1:4	1:2
6	1:1024	1:8	1:4
7	1:256	1:4	1:4
8	1:2048	1:32	1:32
9	1:32	NR	NR
10a	1:1024	1:8	1:8
10b	1:512	1:4	1:2
11a	1:512	1:4	1:4
11b	1:512	1:4	1:4
12a	1:256	1:2	1:2
12b	1:256	1:2	1:2
12c	1:256	1:2	1:1
12d	1:256	1:4	1:2
13	1:512	1:4	1:4
14	1:2048	1:16	1:8
15	1:512	1:8	1:4
16	1:512	1:16	1:8
17	1:2048	1:32	1:16
18	1:512	1:8	1:4
19	1:512	1:16	1:8
20	1:2048	RAC	1:4
21	1:64	1:2	1:2
22	1:512	1:4	1:1
23	1:32	NR	NR
24	1:256	1:8	1:4
25	1:1024	1:16	1:16
25a	NR	NR	NR
25b	NR	NR	NR
27a	1:256	1:2	1:2
27b	1:128	1:2	1:1

Anticorpos anti-Cysticercus cellulosae foram detectados em LCR de pacientes com neurocisticercose através das técnicas ERYTHRO-LIT, RFC e IFI. Na técnica ERYTHRO-LIT foram utilizadas placas de poliestireno - com orifícios recobertos com o extrato bruto de cisticercos. Para a RFC foi utilizado um extrato alcoólico de Cysticercus cellulosae. Para a IFI foi utilizado lâminas de microscopia contendo fragmentos de Cysticercus cellulosae fixados.

NR= não reagente; RAC= reação anticomplementar

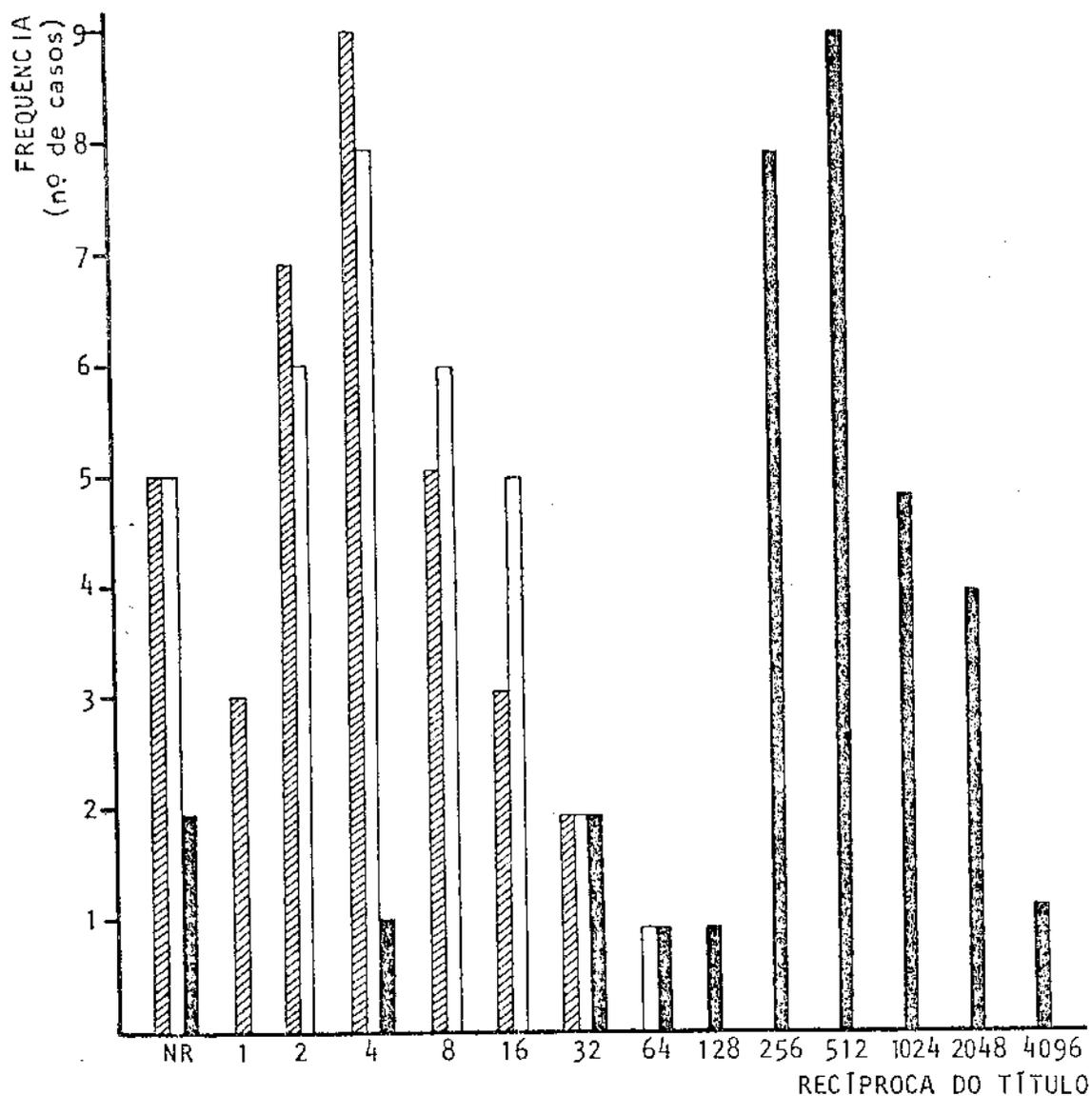


Figura 6. Comparação dos resultados obtidos, na pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae*, em LCR de pacientes com neurocisticercose, utilizando ERYTHRO-LIT (■), RFC (□) e IFI (▨).

Como pode ser observado no quadro II e figura 6, a sensibilidade da técnica ERYTHRO-LIT é maior do que a da IFI ou RFC, respectivamente, 96,3%, 85,2% e 84,6%. Isto é evidenciado pelo fato de 3 amostras de LCR, números 4, 9 e 23, serem reagentes somente com a técnica ERYTHRO-LIT. Por outro lado nas amostras 26a e 26b, provenientes do mesmo paciente, não foram detectados anticorpos com nenhuma das técnicas usadas.

O título de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* também foi avaliado, através de ERYTHRO-LIT, RFC e IFI em

19 amostras de soro provenientes de 14 pacientes com neurocisticercose, e os resultados estão expressos no quadro III.

Q U A D R O III

TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI-CYSTICERCUS CELLULOSAE, DETECTADOS POR ERYTHRO-LIT, RFC E IFI, EM SORO DE PACIENTES COM NEUROCISTICERCOSE.

AMOSTRA DE SORO	TÍTULO DE ANTICORPOS		
	ERYTHRO LIT	RFC	IFI
1	1:8192(1:512)	1:16(1:4)	1:32(1:1)
2	1:8192(1:256)	1:32(1:8)	1:32(1:2)
3	1:16384(1:2048)	1:32(1:16)	1:64(1:8)
4	1:8192(1:1024)	1:32(1:8)	1:64(1:4)
5	1:4096(1:256)	1:16(1:4)	1:32(1:2)
6a	1:8192(1:256)	1:16(1:4)	1:32(1:2)
6b	1:4096	1:8	1:32
7a	1:16384	1:32	1:256
7b	1:16384(1:1024)	1:32(1:8)	1:128(1:4)
8a	1:8192	1:8	1:32
8b	1:4096(1:512)	RAC (1:4)	1:16(1:2)
9	1:256(1:4)	NR (NR)	NR (NR)
10	1:128(NR)	NR (NR)	NR (NR)
11	1:8192	1:16	1:64
12a	1:16384	1:16	1:64
12b	1:8192	1:16	1:64
12c	1:8192	1:16	1:64
13	1:16384	1:8	1:64
14	1:8192	1:32	1:64

Anticorpos anti-Cysticercus cellulosae foram detectados no soro de pacientes com neurocisticercose através das técnicas ERYTHRO-LIT, RFC e IFI. Entre parênteses, colocamos, quando possível, os resultados obtidos com amostras de LCR dos pacientes, coletadas no mesmo dia das amostras de sangue.

NR= não reagente; RAC= reação anticomplementar

O título de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae avaliado através da técnica ERYTHRO-LIT em 15 indivíduos aparentemente normais (alunos do 4º ano de Medicina) apresentou resultados que variaram de 1:128 a 1:256. Desse modo, as amostras de soro 9 e 10 devem ser consideradas como não reagentes.

Como já enfatizado para o LCR, a sensibilidade da técnica ERYTHRO-LIT é maior do que a da RFC ou IFI, como pode ser observado no quadro III.

6. Pesquisa de anticorpos contra componentes do extrato bruto de cisticercos em LCR e soro de pacientes com lues.

Indivíduos com lues podem ter anticorpos capazes de reconhecer componentes das preparações antigênicas de Cysticercus cellulosae. Essa possibilidade foi testada, usando o extrato bruto de cisticercos e a técnica ERYTHRO-LIT, em 11 amostras de LCR de 8 pacientes com neurolues e em 11 amostras de soro de 9 pacientes com lues, e os resultados estão expressos respectivamente, nos quadros IV e V.

Q U A D R O IV

PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA COMPONENTES DO EXTRATO BRUTO DE CISTICERCOS EM LCR DE PACIENTES COM NEUROLUES

AMOSTRA DE LCR	TÍTULO DE ANTICORPOS
1a	1:4(1:64;R)
1b	< 1:2(1:32;R)
1c	< 1:2(1:8 ;R)
2a	1:4(1:32;R)
2b	< 1:2(1:8 ;R)
3	< 1:2(1:32;R)
4	< 1:2(1:16;R)
5	< 1:2(1:32;R)
6	< 1:2(1:8 ;R)
7	< 1:2(NR ;R)
8	< 1:2(1:8 ;R)

Anticorpos contra componentes do extrato bruto de cisticercos foram avaliados por ERYTHRO-LIT em LCR de pacientes com neurolues. Entre parênteses foram colocados, respectivamente, os resultados obtidos com a reação de fixação de complemento para lues e FTA-Abs.

R= reagente

Q U A D R O V

PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA COMPONENTES DO EXTRATO BRUTO DE CISTICERCOS EM SOROS DE PACIENTES COM LUES.

AMOSTRA DE SORO	TÍTULO DE ANTICORPOS
1a	1:256(1:128;1:512)
1b	1:256(1:128;1:512)
2a	1:256(1:32 ;1:128)
2b	1:512(1:128; RAC)
3	1:256(1:64 ;1:256)
4	1:128(1:64 ;1:256)
5	1:256(1:128;1:512)
6	1:512(1:32 ;1:64)
7	1:256(1:128;1:256)
8	1:128(1:256; RAC)
9	1:256(1:64 ;1:256)

Anticorpos contra componentes do extrato de cisticercos foram avaliados por ERYTHRO-LIT em soro de pacientes com lues. Entre parênteses - foram colocados, respectivamente, os resultados obtidos com o V.D.R.L. e a reação de fixação de complemento para lues. RAC= reação anti complementar.

Como pode ser observado no quadro IV, das amostras de LCR testadas, em apenas 2 foram detectados anticorpos contra componentes do extrato bruto de cisticercos, e, ainda assim, em títulos baixos.

Com relação a pesquisa no soro, das amostras testadas, somente 2 apresentaram títulos superiores àqueles encontrados em indivíduos normais, como pode ser observado no quadro V.

7. Comportamento da técnica ERYTHRO-LIT em amostras de LCR e soro não selecionadas

Com o intuito de verificar os resultados obtidos com a técnica ERYTHRO-LIT em material não selecionado, amostras de LCR e soro de 45 pacientes, encaminhados para a coleta de LCR, foram analisadas, sem conhecimento dos dados clínicos antes da realização dos testes, e os resultados estão expressos no quadro VI.

QUADRO VI

COMPORTAMENTO DA TÉCNICA ERYTHRO-LIT COM AMOSTRAS NÃO SELECIONADAS

AMOSTRA DE LCR/SORO	DADOS CLÍNICOS TRANSCRITOS DA REQUISIÇÃO DE EXAMES	LCR	SORO
1	Crise convulsiva	NR (NR)	1:128(NR;ND)
2	Crise convulsiva	1:2(NR)	1:128(NR;ND)
3	Crise convulsiva	NR (NR)	1:64 (NR;ND)
4	Crise convulsiva	NR (NR)	1:256(1:2;NR)
5	Crise convulsiva	NR (NR)	1:512(NR;ND)
6	Crise convulsiva	NR (NR)	1:256(1:4;1:2)
7	Crise convulsiva	NR (NR)	1:256(NR;ND)
8	Crise convulsiva	NR (NR)	1:128(NR;ND)
9	Crise convulsiva	NR (NR)	1:512(RAC;RAC)
10	Crise convulsiva	NR (NR)	1:128(NR;ND)
11	Crise convulsiva	NR (NR)	1:128(NR;ND)
12	Crise convulsiva	NR (NR)	1:128(NR;ND)
13	Crise convulsiva	NR (NR)	1:128(NR;ND)
14	Crise convulsiva	NR (NR)	1:256(1:2;1:2)
15	Crise convulsiva	NR (NR)	1:64 (NR;ND)
16	Crise convulsiva	NR (NR)	1:256(NR;ND)
17	Crise convulsiva tônico-clônico generalizada	NR (NR)	1:256(NR;ND)
18	Crise convulsiva tônico clônico generalizada	1:8(NR)	1:2048(NR;ND)
19	Crise convulsiva tônico clônico generalizada	NR (NR)	1:256(NR;ND)
20	Crises parciais complexas	NR (NR)	1:128(NR;ND)
21	Crises parciais complexas	NR (NR)	1:128(NR;ND)
22	Crises parciais complexas	NR (NR)	1:128(NR;ND)
23	Crises parciais complexas	NR (NR)	1:128(NR;ND)
24	Crise epiléptica	NR (NR)	1:512(NR;ND)
25	Triagem epiléptica	NR (NR)	1:128(NR;ND)
26	Cefaléia	NR (NR)	1:512(NR;ND)
27	Cefaléia	NR (NR)	1:128(1:4;1:4)
28	Cefaléia	NR (NR)	1:256(NR;ND)
29	Cefaléia	NR (NR)	1:512(1:4;1:16)
30	Cefaléia	NR (NR)	1:128(NR;ND)
31	Cefaléia vascular	NR (NR)	1:128(NR;ND)
32	Cefaléia vascular	NR (NR)	1:64 (NR;ND)
33	Cefaléia tenso vascular	NR (NR)	1:64 (NR;ND)
34	Acidente vascular cerebral	NR (NR)	1:128(NR;ND)
35	Acidente vascular cerebral	NR (NR)	1:64 (NR;ND)
36	Seqüela de mielopatia cervical vascular ?	NR (NR)	1:64 (NR;ND)
37	Diminuição da força muscular nos 4 membros	NR (NR)	1:256(NR;ND)
38	Atrofia de papila	NR (NR)	1:128(NR;ND)
39	Dor em hemiface direita ha 21 anos	NR (NR)	1:256(NR;ND)
40	Dificuldade para falar	NR (NR)	1:128(NR;ND)
41	Diminuição do equilíbrio e tremores	1:2(NR)	1:256(RAC;RAC)
42	Provável aracnoidite	NR (NR)	1:256(1:4;1:32)
43	Lues secundária	NR (NR)	1:256(1:64;1:256)
44	VDRL no sangue 1:64	1:2(NR)	1:128(RAC;RAC)
45	História de lues primária	NR (NR)	1:128(NR;ND)

Em amostras de LCR e soro de 45 pacientes não selecionados foi pesquisado a presença de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* utilizando a técnica ERYTHRO-LIT. Entre parênteses, na coluna do LCR, foram colocados os resultados obtidos com a reação de fixação de complemento para cisticercose. Entre parênteses, na coluna do soro, foram colocados, respectivamente, os resultados obtidos com a reação de fixação de complemento para cisticercose e lues.

NR= não reagente; ND= não determinado; RAC= reação anti complementar

Como pode ser observado no quadro VI, em somente um dos pacientes (18) foi detectado anticorpos anti-Cysticercus cellulosae em títulos significativos.

8. Fracionamento do extrato bruto de cisticercos por filtração em Sephadex G-200

A figura 7 mostra o resultado da cromatografia do extrato bruto de cisticercos em Sephadex G-200.

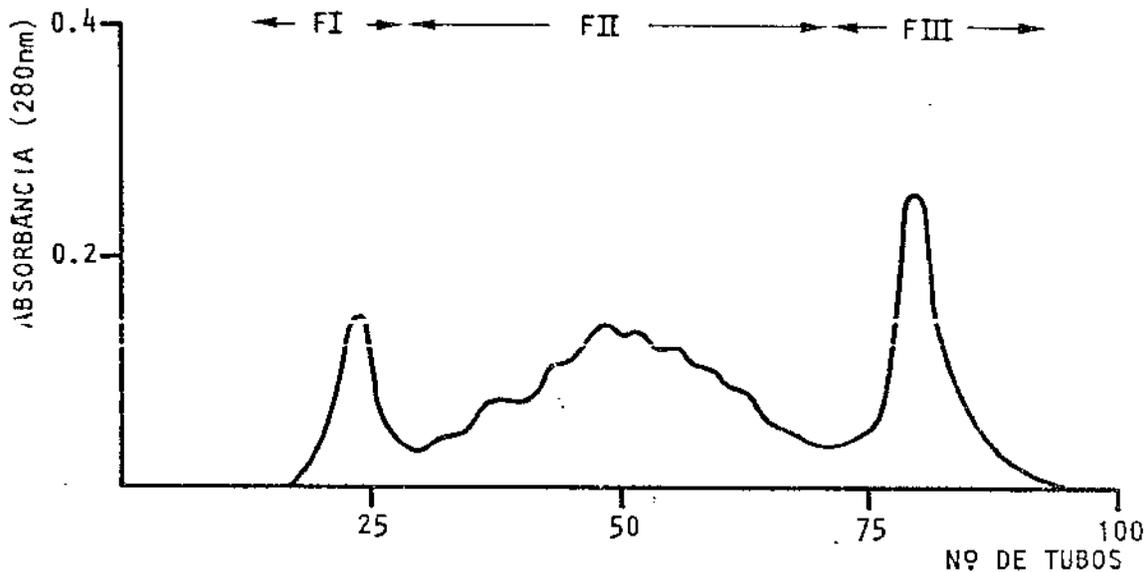


Figura 7. Cromatografia em Sephadex G-200 do extrato bruto de cisticercos. Aliquota de 2,5 ml do extrato bruto de cisticercos, contendo 11,25 mg de proteína, foi aplicada à coluna (2,1x98,5cm) previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01M/NaCl 0,15M, pH= 7,2. A eluição foi processada com o mesmo tampão a uma velocidade de fluxo de 8 ml/hora (1,2 ml/tubo).

O efluente da cromatografia em Sephadex G-200 foi dividido em 3 frações (F I, F II e F III), que foram concentradas por ultrafiltração e estocadas em freezer a - 80°C até o momento do uso.

9. Localização de componentes antigênicos nas frações I, II e III do extrato bruto de cisticercos reconhecidos por anticorpos presentes em LCR de pacientes com neurocisticercose.

Com o intuito de verificar onde se localizavam os componentes antigênicos reconhecidos por anticorpos presentes em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose, o título de anticorpos contra as frações I, II e III, obtidas por filtração do extrato bruto de cisticercos em Sephadex G-200, foi avaliado, por ERYTHRO-LIT, em 8 amostras de LCR, e os resultados estão expressos no quadro VII.

Q U A D R O V I I

LOCALIZAÇÃO DE COMPONENTES ANTIGÊNICOS NAS FRAÇÕES I, II E III RECONHECIDOS POR ANTICORPOS PRESENTES EM LCR DE PACIENTES COM NEUROCISTICERCOSE

AMOSTRA DE LCR	EXTRATO BRUTO DE CISTICERCOS	F I	F II	F III
13	1:512	< 1:8	1:128	< 1:8
14	1:2048	< 1:8	1:512	< 1:8
15	1:512	< 1:8	1:128	< 1:8
16	1:512	< 1:8	1:128	< 1:8
17	1:2048	< 1:8	1:256	1:8
18	1:512	< 1:8	1:64	1:8
19	1:512	< 1:8	1:256	< 1:8
20	1:2048	< 1:8	1:512	< 1:8

Anticorpos contra o extrato bruto de cisticercos e contra as frações I, II e III, foram avaliados por ERYTHRO-LIT em LCR de pacientes com neurocisticercose.

Como pode ser observado no quadro VII, a grande maioria dos anticorpos é dirigida aos componentes da fração II.

10. Verificação da necessidade de utilização de N-acetil -
D-glucosamina no sistema utilizado.

Com o intuito de testar a necessidade de utilização de N-acetil-D-glucosamina, no sistema utilizado, 7 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose foram analisadas, por ERYTHRO-LIT, utilizando ou não o açúcar, e os resultados estão expressos no quadro VIII.

Q U A D R O VIII

VERIFICAÇÃO DA NECESSIDADE DE UTILIZAÇÃO DE N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA USANDO O EXTRATO BRUTO DE CISTICERCOS E CONJUGADO CONTENDO WGA.

AMOSTRA DE LCR	ERYTHRO LIT	
	com N-acetil-D-glucosamina	sem N-acetil-D-glucosamina
1	1:2048	1:2048
5	1:512	1:256
7	1:512	1:256
20	1:256	1:256
21	1:256	1:256
23	1:256	1:128
25	1:1024	1:512

Anticorpos contra os componentes do extrato bruto de cisticercos foram avaliados por ERYTHRO-LIT, utilizando ou não N-acetil-D-glucosamina na realização do teste.

Como pode ser observado no quadro VIII, no sistema utilizado, há a possibilidade de usar a técnica ERYTHRO-LIT sem a utilização de N-acetil-D-glucosamina.

V - D I S C U S S Ã O

A sintomatologia da neurocisticercose é muito variada sugerindo diagnósticos neurológicos e psiquiátricos diversos (REIS et alii, 1979; SHANLEY & JORDAN, 1980, NASH & NEVA, 1984). Devido à grande variedade dos quadros clínicos apresentados pelos pacientes, o diagnóstico clínico é praticamente impossível, quando não auxiliado pelos exames laboratoriais.

Na neurocisticercose, dependendo da sensibilidade da reação imunológica empregada, pode-se encontrar um número significativamente grande de indivíduos comprovadamente doentes sem anticorpos demonstráveis (FLISSER, PÉREZ-MONTEFORT & LARRALDE, 1979; FLISSER, WOODHOUSE & LARRALDE, 1980). Livramento (1981), utilizando imunofluorescência indireta ou reação de fixação de complemento não conseguiu detectar anticorpos em 25% dos LCR de pacientes com neurocisticercose.

O uso de conjugados anticorpo-lectina permitiu o desenvolvimento de técnicas imunológicas com alta sensibilidade. Em particular, o uso de eritrócitos como marcadores, na técnica ERYTHRO-LIT, torna o procedimento muito simples e barato.

Guesdon & Avrameas (1980, 1983), em experimentos de titulação de IgE em soros humanos, mostraram que a técnica ERYTHRO-LIT foi capaz de detectar 1 a 2 UI de IgE/ml. Comparando esses resultados com aqueles obtidos com ENZY-LIT e RADIO-LIT, concluíram que a técnica ERYTHRO-LIT era tão sensível quanto as 2 outras técnicas.

Embora os antígenos de Cysticercus cellulosae sejam capazes de induzir a produção de anticorpos de todas as classes (FLISSER, WOODHOUSE & LARRALDE, 1980), os anticorpos da classe IgG são predominantes (FLISSER, WOODHOUSE & LARRALDE, 1980; MILLER, HEINER & GOLDBERG, 1983; COSTA et alii, 1985).

Nós comparamos os resultados obtidos, em termos de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae, em LCR de pacientes com neurocisticercose, com as técnicas ERYTHRO-LIT e ENZY-LIT, usando, respectivamente, conjugados anti-IgG: WGA e anti-IgG: con A, e mostramos que as técnicas tem a mesma sensibilidade.

Com relação as amostras de LCR de pacientes sem suspeita clínica de neurocisticercose testadas, somente uma foi reagente com a técnica ERYTHRO-LIT, e mesmo assim com título de 1:2.

Devido à sua sensibilidade, comparável a uma técnica imunoenzimática, como a técnica ENZY-LIT, pela reprodutibilidade, por nós testada, pela simplicidade e baixo custo, e pelo fato da WGA poder ser purificada, de modo relativamente fácil, a técnica ERYTHRO-LIT nos pareceu uma técnica adequada para ser usada na pesquisa de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae no LCR.

Pelo fato das reações de fixação de complemento e imunofluorescência indireta, serem ainda as técnicas mais utilizadas na rotina laboratorial para a detecção de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae, devido, principalmente, à simplicidade das técnicas e à disponibilidade

comercial dos reagentes empregados, procuramos comparar os resultados obtidos utilizando essas técnicas convencionais com aqueles obtidos usando ERYTHRO-LIT, em LCR de pacientes com neurocisticercose. Embora o valor da pesquisa de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae no sangue seja menor do que no LCR, em vista das dificuldades e problemas inerentes à coleta desse material, o comportamento da técnica ERYTHRO-LIT foi também verificado em amostras de soros de pacientes com neurocisticercose.

Os resultados obtidos mostraram, como já esperado, uma maior sensibilidade da técnica ERYTHRO-LIT. Isto foi evidenciado pelo fato das amostras de LCR, números 4, 9 e 23 apresentarem, respectivamente, títulos de 1:4, 1:32 e 1:32 com a técnica ERYTHRO-LIT, enquanto que através de fixação de complemento ou imunofluorescência indireta foram não reagentes (QUADRO II).

Com relação à pesquisa de anticorpos no soro usando ERYTHRO-LIT, deve ser salientado que a técnica só foi capaz de discriminar, no sentido diagnóstico, títulos de anticorpos acima de 1:256, valor limite estabelecido com o conjunto de soros normais utilizado. Das amostras de soros de pacientes com neurocisticercose testadas duas apresentaram valores de 1:256. As demais, apresentaram títulos que variaram de 1:4096 a 1:16384. Embora os resultados obtidos com os soros sejam interessantes, deve ser, mais uma vez, ressaltado que na pesquisa de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae no LCR, há maior segurança diagnóstica em vista da baixa frequência com que o SNC, no nosso meio, é parasitado por outros cestóides (LIVRAMENTO, 1980). O mesmo

jã não ocorre com a pesquisa de anticorpos no sangue, de modo que os resultados obtidos com os soros exigem a realização de experiências adicionais para a avaliação do seu valor diagnóstico real.

Com a introdução da tomografia computadorizada (HOUNSFIELD, 1973; AMBROSE, 1973) houve um grande avanço na propedêutica radiológica clínica do SNC.

A tomografia computadorizada colaborou decisivamente na elucidação diagnóstica de diferentes formas de neurocisticercose. Esse método de investigação fornece dados sobre a extensão e localização das lesões causadas pelo parasita, permite avaliar o grau de comprometimento das estruturas cranianas, permite o acompanhamento evolutivo e a avaliação do efeito da terapêutica sobre as lesões (MINGUETTI & FERREIRA, 1982).

No presente trabalho foram utilizadas 34 amostras de LCR de 27 pacientes com neurocisticercose, dos quais 20 haviam se submetido à tomografia computadorizada (QUADRO II - pacientes n^{os}. 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27). Com exceção de um paciente (QUADRO II-paciente n^o 22) com tomografia computadorizada normal, os demais tinham a tomografia com imagens compatíveis com a presença de cisticercos no SNC.

Nos pacientes em que as amostras de LCR foram reagentes por ERYTHRO-LIT e não reagentes por RFC e IFI (QUADRO II- pacientes n^{os} 4, 9 e 23) a tomografia computadorizada revelou imagens compatíveis com a presença de cisticercos no SNC. Além disso, na verificação do comportamento

da técnica ERYTHRO-LIT em amostras de LCR de pacientes não selecionados, a única amostra com valor significativo pertencia a um paciente em que a tomografia computadorizada, realizada posteriormente ao teste imunológico, com base em nosso pedido, revelou a presença de imagens compatíveis com cisticercos ao nível do SNC. (QUADRO VI- paciente nº 18) .

Imagens sugestivas de cisticercos, também foram detectadas em um paciente (QUADRO II - paciente nº 26) em cujas amostras de LCR não foram detectados anticorpos com nenhuma das técnicas utilizadas.

Cabe ressaltar que essas mesmas amostras já tinham sido analisadas pelo Centro de Investigações em Neurologia da Universidade de São Paulo, que também não conseguiu detectar anticorpos através de ELISA, RFC e IFI.

No grupo de pacientes com neurocisticercose havia um paciente (nº 22) com tomografia computadorizada normal e ERYTHRO-LIT, RFC e IFI reagentes.

Embora a tomografia computadorizada tenha permitido grandes progressos no estudo da neurocisticercose, deve ser salientado que quando se diagnostica a doença por este procedimento, a dificuldade que se encontra é a grande variedade das lesões causadas pelo Cysticercus cellulosae no SNC e a similaridade que algumas delas tem com outras, de diferente natureza, ocupando o mesmo espaço e formando potencialmente a mesma imagem (MINGUETTI & FERREIRA, 1982). O diagnóstico por tomografia computadorizada também se torna difícil dependendo do número e localização dos parasitas. Lesões únicas e cistos sub-aracnóides

e intra-ventriculares são de difícil detecção (NASH & NEVA, 1984). Além disto o alto custo dos tomógrafos computadorizados, a manutenção técnica difícil e os gastos operacionais elevados tornam este tipo de recurso diagnóstico inacessível para muitos países em desenvolvimento onde a incidência de neurocisticercose é bastante alta (MINGUETTI & FERREIRA, 1982).

Diante disto, diversos grupos estudando neurocisticercose salientam a importância da pesquisa sistematizada de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae, mediante vários tipos de reações imunológicas.

Vários autores tem salientado a dificuldade no diagnóstico diferencial entre neurolues e neurocisticercose, sendo frequente o aparecimento de reações cruzadas (WILLIAMS, 1948; REIS, BEI & DINIZ, 1949; LIVRAMENTO, 1981; COSTA et alii, 1982).

Utilizando a técnica ERYTHRO-LIT, nós pesquisamos a presença de anticorpos contra componentes do extrato bruto de cisticercos em 11 amostras de LCR de 8 pacientes com neurolues e em 11 amostras de soro de 9 pacientes com lues. Das amostras de LCR testadas em apenas 2 foram detectados anticorpos e em ambas o título foi 1:4, (QUADRO IV amostras 1a e 2a). Com relação à pesquisa no soro deve ser lembrado que a técnica só é capaz de discriminar valores acima de 1:256. Desse modo, em somente 2 amostras foram encontrados valores acima do poder discriminativo do teste (QUADRO V - amostras 2b e 6).

Considerando os títulos de anticorpos encontrados contra

componentes do extrato bruto de cisticercos, em LCR de pacientes com neurocisticercose e neurolues, fica evidente que reações cruzadas, quando ocorrem, se manifestam com títulos baixos de anticorpos.

Na pesquisa de anticorpos anti- Cysticercus cellulosae, uma série grande de preparações antigênicas tem sido usadas (BIAGI & TAY, 1958; PROCTOR, POWELL & ELSDON - DEW, 1966; MAHAJAN, CHITKARA & CHOPRA, 1974; FLISSER et alii, 1975; FLISSER, PÉREZ-MONTFORT & LARRALDE, 1979; COSTA et alii, 1982; FLISSER et alii, 1982; NASCIMENTO & MAYRINK, 1984).

Em 1958, BIAGI & TAY fizeram 22 preparações antigênicas, a partir de Cysticercus cellulosae total, fluido vesicular, escólex e membrana, empregando diferentes métodos. Utilizando reações de precipitação em tubos, através de estudos de sensibilidade e especificidade, selecionaram uma preparação obtida a partir de cisticerco total. Esta consistia basicamente de um extrato salino dos parasitas, previamente macerados e lavados 3 vezes com acetona.

Em 1975, Flisser et alii, utilizando soros de indivíduos com diferentes probabilidades de terem cisticercose e três preparações antigênicas obtidas a partir de escólex, parede e líquido vesicular, mostraram que a menor quantidade de resultados falso-positivos era encontrada usando a preparação de parede, seguida pelas preparações de escólex e líquido vesicular; a menor quantidade de resultados falso-negativos era encontrada com a preparação de escólex, seguida pelas preparações de líquido vesicular e parede.

No presente trabalho n̄os usamos um extrato salino dos parasitas ap̄os a retirada do fluido vesicular e tratamento com acetona.

O uso de extratos brutos de parasitas, como fonte de antígenos, pode explicar a falta de sensibilidade e/ou especificidade dos métodos imunodiagn̄osticos. Nos extratos brutos, antígenos relevantes podem estar em concentrações inadequadas, bem como materiais estranhos ao parasita podem estar presentes (FLISSER, PÉREZ-MONTFORT & LARRALDE, 1979).

O perfil de eluição do extrato bruto de cisticercos de Taenia solium em Sephadex G-200 revelou 2 picos distintos e, entre os mesmos, vários picos menores, semelhante ao perfil obtido por Kwa & Liew (1977) com o extrato bruto de cisticercos de laenia taeniaeformis. Usando LCR de pacientes com neurocisticercose n̄os mostramos que a grande maioria dos anticorpos anti- Cysticercus cellulosae era dirigida aos componentes da fração II (QUADRO VII).

Embora com títulos baixos, em amostras de LCR de pacientes com neurolues foram detectados, por ERYTHRO-LIT, anticorpos capazes de reconhecer componentes do extrato bruto de cisticercos. Futuramente, seria interessante verificar se esses anticorpos reconhecem preferencialmente componentes de uma das frações obtidas com a cromatografia do extrato bruto de cisticercos em Sephadex G-200, particularmente componentes das frações I e III.

Para realização da técnica ERYTHRO-LIT usando conjugado anticorpo - WGA a maior dificuldade, em relação

aos reagentes é a obtenção do açúcar N-acetil-D-glucosamina. Na técnica, o conjugado é normalmente diluído em meio contendo o açúcar específico para a lectina usada, afim de que os sítios ativos da lectina sejam ocupados e não reajam com eventuais constituintes da preparação antigênica.

No presente trabalho, nós testamos a possibilidade de usar conjugado anticorpo -WGA diluído em meio sem o açúcar. Com a preparação antigênica usada, os resultados obtidos permitem concluir que não há necessidade de usar o açúcar em questão. Esse fato, vem comprovar, mais uma vez, a utilidade da técnica ERYTHRO-LIT para fins de diagnóstico e pesquisa.

VI - RESUMO E CONCLUSÕES

1. As técnicas ERYTHRO-LIT e ENZY-LIT são baseadas na utilização de conjugados contendo lectinas com afinidade para porções de carboidratos presentes, respectivamente, em eritrócitos e enzimas. A comparação dos resultados obtidos com as técnicas ERYTHRO-LIT e ENZY-LIT, em termos de título de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae, em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose, mostrou que as duas técnicas tem a mesma sensibilidade.

2. A comparação dos resultados obtidos na pesquisa de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae, em LCR e soro de pacientes com neurocisticercose, utilizando ERYTHRO-LIT e as reações convencionais de fixação de complemento e imunofluorescência indireta, mostrou, como já esperado, uma maior sensibilidade da técnica ERYTHRO-LIT. Isto foi evidenciado, em particular, pelo fato de amostras de LCR de três pacientes apresentarem títulos de 1:4, 1:32 e 1:32 com a técnica ERYTHRO-LIT enquanto que através de reação de fixação de complemento e imunofluorescência indireta foram não reagentes. De importância é o fato dos três pacientes terem tomografia computadorizada compatível com a presença de cisticercos ao nível do SNC. No soro a técnica ERYTHRO-LIT só foi capaz de discriminar, no sentido diagnóstico,

valores acima de 1:256, valor este estabelecido com um conjunto de soros normais, tratado nas mesmas condições.

3. No grupo estudado de 27 pacientes com neurocisticercose, 20 haviam se submetido à tomografia computadorizada. Em um dos pacientes, cuja tomografia revelou imagens compatíveis com a presença de cisticercos ao nível do SNC, não foram detectados anticorpos com nenhuma das técnicas utilizadas. Por outro lado, em outro paciente com tomografia computadorizada normal foram detectados anticorpos através de ERYTHRO-LIT, reação de fixação de complemento e imunofluorescência indireta. Isto ressaltava a importância da pesquisa sistematizada de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae em amostras de LCR de pacientes com suspeita de neurocisticercose.

4. Anticorpos anti-Cysticercus cellulosae foram pesquisados através de ERYTHRO-LIT, reação de fixação de complemento e imunofluorescência indireta em amostras de LCR e soro de 45 pacientes não selecionados, sem o conhecimento prévio dos dados clínicos. Dos pacientes estudados havia um em que as amostras de LCR e soro apresentaram, respectivamente, títulos de 1:8 e 1:2048, enquanto que as reações de fixação de complemento e imunofluorescência indireta, tanto no LCR como no soro foram não reagentes. Nesse paciente a tomografia computadorizada, realizada posteriormente, a nosso pedido, revelou a presença de imagens compatíveis com neurocisticercose.

5. Uma série de trabalhos tem ressaltado a dificuldade no diagnóstico diferencial entre neurocisticercose e neurocisticercose, sendo freqüente o aparecimento de reações

cruzadas. Considerando os títulos de anticorpos encontrados contra os componentes do extrato bruto de cisticercos, em LCR e soro de pacientes com neurocisticercose e neuro-lues, fica evidente que reações cruzadas, quando ocorrem, se manifestam com títulos baixos de anticorpos. Das onze amostras de LCR de pacientes com neuro-lues testadas, em somente duas foram detectados anticorpos contra os componentes de extrato bruto de cisticercos, e em ambas o título foi de 1:4. Das onze amostras de soro testadas, em somente duas o título encontrado (1:512) foi maior do que 1:256.

6. O perfil de eluição de extrato bruto de cisticercos em Sephadex G-200 revelou 2 picos distintos (frações I e III) e, entre os mesmos, vários picos menores (fração II). Utilizando a técnica ERYTHRO-LIT foi mostrado que a grande maioria dos anticorpos anti-Cysticercus cellulosae, presentes em LCR de pacientes com neurocisticercose, é dirigida contra componentes da fração II.

7. Devido à sua sensibilidade, comparável a uma técnica imunoenzimática, pela reprodutibilidade, pela simplicidade, baixo custo e fácil disponibilidade dos reagentes em nosso meio, a técnica ERYTHRO-LIT pode ser considerada como uma ótima alternativa para os testes convencionais de rotina e de pesquisa, tendo sido demonstrado, a nosso ver, ser uma técnica adequada para a pesquisa sistematizada de anticorpos anti-Cysticercus cellulosae, em particular no LCR.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N. & AGUILLAR, F. J. Studies on cysticercosis in Central America and Panama. Am. J. trop. Med. Hyg., 13(1):48-53, 1964.

AMBROSE, J. Computerized transverse axial scanning (tomography): II. Clinical application. Br. J. Radiol., 46(552):1023-47, 1973.

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., Basel, 35(1):63-7, 1978.

BIAGI, F. F. & PINHÄ, A. P. Presence of antigens in calcareous corpuscles of cysticercus. Revta. Inst. Med.trop . S Paulo, 6(3):114-6, 1964.

BIAGI, F.F. & TAY, J. A precipitation reaction for the diagnosis of cysticercosis. Am. J. trop. Med., 7(1):63-5, 1958.

- BIAGI, F. & WILLMS, K. Immunologic problems in the diagnosis of human cysticercosis. Annls. Parasit.hum. comp., 49(5):509-13, 1974.
- BIGUET, J.; CAPRON, A.; KY, P. T. & HAUSSY, R. Étude immunoelectrophorétique comparée des antigènes de divers helminthes. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 254:3600-2, 1962.
- BROTTO, W. Aspectos neurológicos da cisticercose. Archos Neuropsiquiat., S Paulo, 5(3):258-94, 1947.
- CANELAS, H.M. Neurocisticercose: incidência, diagnóstico e formas clínicas. Archos Neuropsiquiat. S Paulo, 20(1):1-16, 1962.
- COSTA, J.M.; FERREIRA, A.W; MAKINO, M. M. & CAMARGO, M.E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. Revta.Inst. Med.trop. S Paulo, 24(6):337-41, 1982.
- COSTA, J. M.; MINEO, R.; LIVRAMENTO, J.A. & CAMARGO, M. E. Detecção pelo teste imunoenzimático ELISA de anticorpos IgM anti-**Cysticercus cellulosae**. Archos Neuropsiquiat. S Paulo, 43(1):22-8, 1985.
- FLISSER, A.; TARRAB, R.; WILLMS, K. & LARRALDE, C. Immuno electrophoresis y doble inmunodifusion en el diagnostico de la cisticercosis cerebral humana. Arch. Invest.med., México, 6(1):1-12, 1975.

- FLISSER, A.; PÉREZ.MONTFORT, R. & LARRALDE, C. The immunology of human and animal cysticercosis. Bull. Wld Hlth. Org., 57(5):839-56, 1979.
- FLISSER, A.; WOODHOUSE, E. & LARRALDE, C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. Clin. Exper. Immunol. 39(1):27-37, 1980.
- FLISSER, A.; RIVERA, L.; TRUEBA, J.; ESPINOZA, B. ; YAKOLEFF-GREENHOUSE, V.; SIERRA, A. & LARRALDE, C. Immunology of human neurocysticercosis. In: Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. & Beltran, F., ed. Cysticercosis; present state of knowledge and perspectives, New York, Academic, 1982, p. 549-563.
- GARVEY, J. S.; CREMER, N.E. & SUSSDORF, D.H. Methods in Immunology; a laboratory text for instruction and research. Massachusetts, W. A. Benjamin, 1977, 545 p.
- GUESDON, J.L. & AVRAMEAS, S. Lectin immuno tests : quantitation and titration of antigens and antibodies using lectin-antibody conjugates. J.Immunol.Methods , 39(1/2):1-13, 1980.
- GUESDON, J.L. & AVRAMEAS, S. Use of lectin - antibody conjugates for quantitation and titration of antigens and antibodies. Meth.Enzym., 92:489-98, 1983.

- GUILAIN, G.; PERON, N & THÉVENARD, A. Le liquide céphalorachidien dans la cysticerose cérébrale. C. r. Séanc. Soc. Biol., Paris, 95:455-7, 1926.
- HOUNSFIELD, G. N. Computerized transverse axial scanning (tomography). I. Description of system. Br. J. Radiol., 46(552):1016-22, 1973.
- KOLMER, J.A.; SPAULDING, E.H. & ROBINSON, H.W. Methods for conducting complement fixation tests for syphilis and other diseases. In: Approved Laboratory Technic, New York, Appleton, 1951, p. 797-855.
- KWA, B. H. & LIEW, F.Y, Immunity in taeniasis-cysticercosis . I. vaccination against *Taenia taeniaeformis* in rats using purified antigen. J.exp.Med., 146(1):118-31, 1977.
- LANGE, O. Síndrome liquórico da cisticercose encéfalo - meningéia. Revta. Neurol. Psychiat., S Paulo, 6 (2) : 35-47, 1940.
- LIVRAMENTO, J.A. Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. São Paulo, 1980. (Tese-Doutorado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

- LIVRAMENTO, J.A. Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. Archos Neuropsiquiat., S Paulo, 3 (3) : 261-78, 1981.
- MACHADO, A.J.; CAMARGO, M. E. & HOSHINO, S. Reação de imunofluorescência para a cisticercose com partículas de **Cysticercus cellulosae** fixadas à lâminas de microscopia. Revta. Soc.bras. Med. Trop. 7(3): 181-3, 1973.
- MAHAJAN, R.C. Geographical distribution of human cysticercosis. In: Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. & Beltran, F. ed. Cisticercosis; present state of knowledge and perspectives, New York, Academic, 1982, p.39-46.
- MAHAJAN, R.C.; CHITKARA, N.L. & CHOPRA, J.S. Evaluation of cysticercous and adult worm antigens in serodiagnosis of cysticercosis. Indian J. med.Res., 62(9):1310-13, 1974.
- MILLER, B.L.; HEINER, D.; GOLDBERG, M.A. The immunology of cerebral cysticercosis. Bull.clin.Neurosci., 48 : 18-23, 1983.
- MINGUETTÍ, G. & FERREIRA, M.V.C. Ação de corticoides na fase aguda da neurocisticercose. Archos Neuropsiquiat., S Paulo, 40(1):77-85, 1982.

- NAGATA, Y. & BURGER, M. M. Wheat germ agglutinin. Isolation and crystallization : J . bio. Chem., 247(7):2248-50 , 1972.
- NAGATA, Y.; GOLDBERG, A.R. & BURGER, M.M. The isolation and purification of wheat germ and other agglutinins . Meth.Enzym., 32:611-5, 1974.
- NASCIMENTO, E. & MAYRINK, W. Avaliação de antígenos de Cysticercus cellulosae no imunodiagnóstico da cisticercose humana pela hemaglutinação indireta. Revta. Inst . Med. trop., S Paulo, 26 (6):289-94, 1984.
- NASH, T. E. & NEVA, F.A. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. New Engl.J.Med., 311(23):1492-5, 1984.
- NIETO, D. Historical notes on cysticercosis. In: Flisser , A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. & Beltran, F., ed. Cysticercosis; present state of knowledge and perspectives, New York, Academic, 1982 , p. 1-7.
- PETITHORY, J.; JAY, M. & FEILLET, M. Le diagnostic par immunoelectrophorese et Ouchterlony de la cisticercose . Encēphale, 60(1):24-35, 1971.

- PROCTOR, E.M.; POWELL, S.J. & ELSDON-DEW, R. The serological diagnosis of cysticercosis. Ann.trop.Med . Parasit., 60(2):146-51, 1966.
- REIS, J.B.; BEI, A.; DINIZ, H.B. Dificuldade no diagnóstico diferencial entre cisticercose encefálica e neuro_lues., Archos Neuropsiquiat., S Paulo, 7(2):156-64 , 1949.
- REIS, J. B.; BEI, A.; REIS-FILHO, J. B. & NASSER, J. Líquido cefalorraquiano na cisticercose encefálica . Archos Neuropsiquiat., S Paulo, 37(2):113-26, 1979.
- SCHENONE, H.; VILLARROEL, F.; ROJAS, A. & RAMÍREZ, R . Epidemiology of human cysticercosis in Latin America . In: Flisser, A.; Willms, K.; Lacleite, J.P.; Larraide, C.; Ridaura, C. & Beltran, F., ed. Cysticercosis ; present state of knowledge and perspectives, New York, Academic, 1982, p. 25-38.
- SHANLEY, J.D. & JORDAN, M. C. Clinical aspects of CNS cysticercosis. Arch. int. Med., 140(10):1309-13, 1980.
- SPINA-FRANÇA, A. Cisticercose do sistema nervoso central. Considerações sobre 50 casos. Revta. paul.Med., S Paulo, 48(1):59-70, 1956.

- SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; BACHESCHI, L.A. & GARCIA-LOPES, P. Cerebrospinal fluid immunoglobulins in cysticercosis of the central nervous system. Archos Neuropsiquiat. S Paulo, 34(1):40-5, 1976.
- TAKAYANAGUI, O.M. & JARDIM, E. Aspectos clínicos da neurocisticercose. Análise de 500 casos. Archos neuropsiquiat., S Páulo, 41(1):50-63, 1983.
- VAERMAN, J.P.; HEREMANS, J.F. & VAERMAN, C. Studies of the immunoglobulins of human serum. I. A method for the simultaneous isolation of the three immunoglobulins (gamma-SS, gamma-1M and gama-1A) from individual small serum samples. J. Immun., 91(1):7-10, 1963.
- WILLIAMS, A.A. Cysticercosis cerebri mistaken for cerebral syphilis; report of a case. Lancet, 255(2):144, 1948.
- WILLIAMS, J.F. & SANDEMAN, R.M. Antigens of Taenid cestodes. In: Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P. ; Larralde, C.; Ridaura, C. & Beltran, ed. Cysticercosis; present state of knowledge and perspectives, New York, Academic, 1982, p. 525-537.
- WILLMS, K. & ARCOS, L. Host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. Expl. Parasitol., 43:396-406, 1977.

WOLTERS, G.; KUIJPERS, L.; KACARI, J. & SCHUURS, A. -
Solid-phase enzyme-immunoassay for detection of hepatitis
B surface antigen. J. clin. Path., 29:873-9, 1976.

WOODHOUSE, E.; FLISSER, A. & LARRALDE, C. Seroepidemiology
of human cysticercosis. In: Flisser, A.; Willms, K ;
Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridauro, C. & Beltran, F. ,
ed. Cysticercosis; present state of knowledge and
perspectives, New York, Academic, 1982; p.11-23.