

Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra-*Cysticercus bovis*

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for immunodiagnostic of bovine cysticercosis and kinetics of antibodies production against-*Cysticercus bovis*

João Carlos Minozzo¹ Vanete Thomaz-Socol² Carlos Chaves Olortegui³
Vando Edésio Soares⁴ Alvimar José da Costa⁵

RESUMO

Um teste de ELISA indireto (ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) foi desenvolvido para pesquisa de anticorpos contra-*C. bovis* em bovinos experimental e naturalmente infectados. Foram estudados três antígenos: antígeno parcial de *C. cellulosae*, antígeno total de *C. bovis* e antígeno total de *C. longicollis*. Na padronização do ELISA, foram analisadas as seguintes combinações: antígeno 250 e 500 ng de proteína/cavidade, diluição dos soros 50, 100, 200 e 400 vezes, diluição do conjugado (IgG de cabra anti-IgG bovina conjugada com peroxidase) 400 e 800 vezes. Do cruzamento das condições acima, resultou a seguinte padronização: antígeno 250ng cavidade⁻¹, soro e conjugado diluídos 100 e 400 vezes, respectivamente. O nível de corte (cut-off) da reação entre animais reagentes e não reagentes foi determinado pela média das densidades óticas de 54 soros negativos acrescidas de três desvio-padrão, resultando no valor de 0,303. Através da prova ELISA, foram comparadas as reatividades dos antígenos parcial de *C. cellulosae*, total de *C. bovis* e total de *C. longicollis* com soros de bovinos portadores de cisticercose, empregando as diluições de soros e de conjugados padronizados anteriormente. O antígeno de *C. bovis* mostrou alta correlação com o teste padronizado com *C. cellulosae*. Entretanto, os valores de absorbância foram sensivelmente menores. Com *C. longicollis*, observou-se reatividade bastante baixa, porém aumentando-se a quantidade de antígeno, até 3000ng/cavidade, houve um aumento proporcional da resposta. Após a padronização do teste, foi analisado o comportamento imunológico de bezerras infectadas experimentalmente com ovos de *Taenia saginata*. Dez bezerras foram infetadas oralmente com 2×10^4 ovos de *T. saginata*. Seis bezerras não infetadas foram usados como controle. Sete amostras de soro de cada animal foram analisadas. A primeira foi colhida no dia da infecção e o restante, quinzenalmente até o abate. A produção máxima de anticorpos foi observada entre 30 e 60 dias

pós-infecção. Depois de 90 dias da infecção os animais foram sacrificados e o número de cistos contados e comparados com a resposta imunológica dos animais. Com o teste padronizado pesquisaram-se anticorpos contra-*C. bovis*, em soros de bovinos considerados não portadores de cisticercos pelo serviço de inspeção e, de 20 amostras de soros analisadas, duas apresentaram valores de absorbância acima do "cut-off" indicando serem portadores de cisticercos.

Palavras-chave: imunodiagnóstico, cisticercose bovina, antígeno homólogo, antígeno heterólogo.

ABSTRACT

An indirect ELISA (ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) was developed for searching of antibodies against-*Cysticercus bovis* in bovine. Three antigens were studied: partial antigen of *C. cellulosae*, total antigen of *C. bovis*, and total antigen of *C. longicollis*. In the standardization of the ELISA the following combinations were analyzed: antigen 250 and 500ng of protein/well, dilution of the sera 50, 100, 200, and 400 times, dilution of the conjugated (anti bovine -IgG conjugated IgG of goat with peroxidase) 400 and 800 times. The crossing of the conditions above resulted in the following standardization: antigen 250ng/well, sera and conjugated diluted 100 and 400 times respectively. The reaction cut-off between reagents and non-reagents animals was determined by the average of the optic densities of 54 negative sera plus three standard deviation resulting in the value of 0,303. The reactivity of the three antigens used in the ELISA test was compared using sera from experimentally infected calves, using sera dilutions and conjugated standardized previously. Using the antigen of *C. bovis* was verified high correlation with the test standardized with *C. cellulosae*. However, the absorbance values were significantly smaller. With *C. longicollis* was observed low reactivity, but increasing the amount of antigen, up to 3000ng/well, there was a

¹ Pesquisador do Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológico (CPPPI), Curitiba, Brasil e Professor Substituto de Parasitologia Animal, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

² Médico Veterinário, Mestre, Doutor e Professor de Parasitologia Veterinária e Parasitologia Molecular, UFPR, Centro Politécnico Jardim das Américas, 81530-320 Curitiba, PR. E-mail: vasocol@ufpr.br. Autor para correspondência

³ Biólogo, Mestre, Doutor e Pesquisador do Instituto Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG.

⁴ Doutorando UNESP/Jaboticabal.

⁵ Veterinário, Mestre, Doutor e Professor Titular de Parasitologia Veterinária, Centro de Pesquisa em Parasitologia, Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal.

proportional increase of the response. The kinetics of antibodies anti-*C. bovis* production was studied in ten calves experimentally infected with 2×10^4 *T. saginata* eggs. Six non-infected calves were used as control. After 90 days from the infection date, the animals were killed. Seven samples of sera of each animal were analyzed. The first was picked in the day of the infection and the remaining at each 15 days. The maximum production of antibody was observed between 30 and 60 days post infection. With the standardized test it was detected antibodies against-*C. bovis*, in 2 from 20 cattle considered as non-holder of cyst by the inspection service. These animals could be considered possible cyst holders.

Key words: ELISA test, *Cysticercus bovis*, homologue antigen, heterologue antigeno.

INTRODUÇÃO

A cisticercose é uma zoonose cujo agente etiológico é um cestoda da família *Taeniidae*, gênero *Taenia*. Estes parasitas evoluem em dois hospedeiros, um definitivo (homem) e outro intermediário (geralmente animais domésticos). Duas são as espécies de *Taenia* endêmicas no Brasil: *Taenia solium* e *Taenia saginata*. A prevalência da *T. saginata* pode ser dividida em três grupos: 1- altamente endêmica, em países ou regiões com prevalência, na população humana, acima de 10%; 2- moderada prevalência, com taxa de infecção entre 0,1 e 10% e baixa prevalência, com taxa de infecção inferior a 0,1% ou mesmo livres da endemia (PAWLOWSKI & SCHULTZ, 1972). Países da América do Sul são considerados de moderada prevalência (GEMMELL et al., 1983, FLISSER et al., 1997).

No Brasil, não existem dados conclusivos quanto à prevalência da teniose em humanos e a cisticercose bovina. No Paraná, em levantamento coproparasitológico realizado em rotina nos laboratórios da rede pública (LACEN) entre os anos 1990-1993, num total de 539.741 exames, foram observados 0,54% positivos para ovos de *Taenia* sp. Em algumas Regionais de Saúde (RS), foram observados índices mais elevados, como, por exemplo, a 13ª RS (Cianorte) e 23ª RS (Curitiba - região metropolitana norte) com, respectivamente, 3,07% e 1,60%. Quanto à cisticercose bovina no Brasil, SANTOS (1993) relata um índice de 5,10% de animais infectados por cisticercos. No estado do Paraná, KOWALESKI (2002), em levantamento realizado em frigoríficos, encontrou um índice de 3,82% ao inspecionar 26.633 bovinos.

Rotineiramente o diagnóstico da cisticercose bovina é baseado na inspeção visual, após cortes específicos na musculatura. Porém, a

sensibilidade do método é baixa, especialmente em infecções leves. Vários testes imunológicos têm sido propostos para esta finalidade (GEMMELL et al., 1983, ONYONG et al., 1996, CHAPMAN et al., 1998). O desenvolvimento de um método diagnóstico confiável poderia servir como alternativa ou aperfeiçoamento da inspeção nos matadouros, em investigações epidemiológicas ou na rastreabilidade deste agente patogênico.

Os objetivos deste trabalho foram: padronizar um método imunoenzimático para o diagnóstico da cisticercose bovina; avaliar a cinética de produção de anticorpos por bovinos experimentalmente infectados com ovos de *T. saginata*, levando em consideração a detecção e quantificação de anticorpos específicos, e testar a aplicabilidade do teste em animais naturalmente infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Infecção experimental

Obtenção de proglotes e ovos de *Taenia saginata*. Proglotes grávidas de *Taenia* sp. foram obtidas de pacientes não tratados com anti-helmínticos, junto ao Laboratório Municipal de Curitiba e conservadas em temperatura de 4°C, por até quatro meses. Um total de 30 proglotes foram obtidas durante este período e identificadas como *Taenia saginata*, pelo número de ramificações uterina (15-30 ramificações). A identificação foi feita por compressão entre lâminas e análise ao microscópio entomológico (12 e 30x) e óptico (40x). As proglotes foram dissecadas com auxílio de estilete e os ovos foram colocados em solução salina 0,85%. A viabilidade dos mesmos foi testada segundo metodologia proposta por OWEN, 1984, antes de preparar as alíquotas para a infecção experimental.

Bovinos. Para o estudo da resposta antigênica de bovinos frente à infecção por ovos de *T. saginata* foram infectados 11 bezerros da raça holandesa preto e branco na faixa etária de dois a 15 meses. Alíquotas de 2×10^4 ovos viáveis foram colocadas em seringas de 20mL e administrada por via oral para cada animal. Um segundo grupo de seis bezerros não infectados, da mesma faixa etária, serviram como controle negativo.

Amostras de soros dos animais infectados e dos não infectados foram colhidas no dia da infecção e quinzenalmente até o abate (90 dias pós-infecção).

Teste de ELISA para imunodiagnóstico da cisticercose bovina

O teste de ELISA seguiu os passos propostos por ENGVAL & PERLMANN, 1971 e modificados para o presente trabalho. Na padronização do teste, para este experimento, foram estabelecidos os valores das seguintes variáveis: concentração de antígeno, diluição do conjugado e diluição dos soros

Soros referência

Os soros controles negativos e controles positivos (soros referências) foram adicionados nas placas para a padronização de cada parâmetro: diluição do conjugado, dos soros, concentração ideal de antígeno e cinética de produção de anticorpos.

Antígenos

O presente ensaio envolveu a análise comparativa do antígeno parcial de *Cysticercus cellulosae*; antígeno total de *C. bovis* e de *C. longicollis*. O antígeno de *C. cellulosae* foi obtido a partir de cisticercos (200) retirados da musculatura de suínos com infecção natural e submetidos às seguintes etapas: remoção da membrana de reação do hospedeiro e da membrana do parasita; lavagem exaustiva dos cistos em solução salina (0,85%) e dessecação à temperatura de -20°C; homogeneização com pistilo, ressuspensão com 20mL água destilada estéril e maceração em homogeneizador de tecidos. O material resultante foi tratado com ultra-som (20 Khz, 1 mA) por período de 30 segundos com intervalo de 30 segundos, por quatro vezes. Foi realizada a isotonização com solução salina (0,3M de NaCl) em igual volume. Todas as etapas foram realizadas sob refrigeração. Após a isotonização a mistura foi novamente submetida ao ultra-som e deixada sob agitação por 12 horas a temperatura de 2 a 8°C. A seguir, o conteúdo foi centrifugado a 7.500g, por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a 10.000g, por 30 minutos a 4°C, e dividido em alíquotas de 1mL e dosado proteínas pelo método de LOWRY et al., (1951). Finalmente o produto foi liofilizado. A produção do antígeno foi obtida de uma adaptação dos métodos propostos por COSTA (1986) e VAZ & FERREIRA (1988).

O antígeno de *C. bovis* foi produzido de forma idêntica ao do *C. cellulosae*, com a exceção de excluir dos cisticercos apenas a camada externa de tecido inflamatório produzido pelo hospedeiro. O antígeno de *C. longicollis* (FREEMAN, 1962) foi produzido no Instituto Adolfo Lutz, (VAZ, 1993;

PINTO et al., 2000) e gentilmente cedido pela Dra. Adelaide Vaz.

Conjugado

O conjugado foi produzido segundo NAKANE & KAWOI, 1974, sendo usado anti-IgG bovina produzido em cabra, conjugado com a enzima peroxidase (IgG de cabra anti-IgG de bovino).

Cut-off

Para estabelecer o ponto de corte da reação entre soro reagentes e não reagentes foram usados seis animais controles negativos, cujos soros foram colhidos durante todo o experimento. Assim, o "cut-off" foi calculado sobre 54 amostras de soros, utilizando-se a média aritmética dos valores de absorbância, acrescentando-se ao valor, três desvios padrão da média.

RESULTADOS

Infecção experimental

Na inspeção de rotina dez animais dos 11 infectados com ovos de *T. saginata*, apresentaram *C. bovis* nos tecidos. O décimo primeiro animal foi considerado negativo na inspeção de rotina e quando feitos cortes paralelos dos tecidos foram encontrados 11 cistos. Do total de cistos recuperados, 47,54% eram vivos e 52,45% estavam caseosos ou calcificados (Tabela 1). Os animais controles também foram submetidos à rigorosa inspeção para comprovar que eram negativos e que não houve contaminação no

Tabela 1- Número de cisticercos vivos, degenerados e calcificados recuperados de bovinos 90 dias pós-infecção experimental com 20.000 ovos de *Taenia saginata*.

| Número do animal | Vivos | Cisticercos recuperados | | TOTAL |
|------------------|-------|-------------------------|--------------|-------|
| | | Degenerados | Calcificados | |
| 1 | 568 | 10 | 7 | 585 |
| 3 | 0 | 60 | 44 | 104 |
| 4 | 2 | 5 | 4 | 11 |
| 9 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 466 | 2767 | 1954 | 1954 | 6675 |
| 426 | 845 | 301 | 0 | 1146 |
| 416 | 1204 | 0 | 0 | 1204 |
| 457 | 1041 | 1079 | 602 | 2722 |
| 475 | 2969 | 2356 | 2235 | 7560 |
| 498 | 471 | 602 | 301 | 1374 |
| 401 | 845 | 301 | 0 | 1146 |
| TOTAL | 10712 | 6670 | 5147 | 22529 |

período do experimento, justificando assim, a utilização destes para o cálculo do nível de corte da reação.

Teste de ELISA

A partir de 200 cistos (*C. cellulosae*) dessecados obteve-se 38 frascos de 1mL que foram liofilizados e acondicionados até seu uso. No momento da utilização, o antígeno foi reconstituído com PBS 0,05M com 0,15M de NaCl, pH 7,4 e centrifugado a 3.000g por cinco minutos. A concentração protéica do antígeno foi de 0,4mg mL⁻¹. Trabalhou-se inicialmente com a concentração de 250 e 500 nanogramas (ng) de proteína por cavidade. Nos ensaios, feitos com as duas concentrações de antígeno, não se observaram diferenças significativas, quando realizadas com soros de animais positivos e negativos. Por razão de economia de antígeno optou-se por utilizar 250ng de proteínas por cavidade.

Os testes iniciais com antígeno total de *C. bovis* seguiram os mesmos padrões de concentração de proteínas do antígeno de *C. cellulosae*, ou seja, 250ng. O antígeno foi produzido a partir de 200 cisticercos e obteve-se 30 frascos de 1mL com concentração protéica de 0,39mg mL⁻¹.

Para o antígeno de *C. longicollis* trabalhou-se inicialmente com 250ng por cavidade. Os valores de absorvância foram extremamente baixos e a concentração foi sendo aumentada até chegar a 3,0 µg de proteína por cavidade. A concentração protéica do antígeno utilizado foi de 4,8mg por mL.

Os ensaios do teste ELISA foram realizados diluindo-se os soros dos bovinos em 50, 100, 200 e 400 vezes. Verificou-se nas diluições 200 e 400 vezes uma diminuição acentuada dos valores de absorvância dos bovinos portadores de cisticercose, com tendência de aproximação de valores de animais negativos. Assim, optou-se pela diluição de 100 vezes.

O conjugado foi diluído em 400 e 800 vezes. Verificou-se melhor discriminação entre animais cisticercóticos e não cisticercóticos na diluição do conjugado de 400 vezes.

Para o estabelecimento do nível de corte da reação entre soros positivos e negativos, trabalhou-se com antígeno de *C. cellulosae* na concentração de 250ng de proteína por cavidade e conjugado diluído 400 vezes. As 54 amostras de soros dos animais controles negativos foram diluídos em 100 vezes para a obtenção das densidades ópticas, cálculo da média e o desvio padrão. Para as condições estudadas, o "cut-off" ficou estabelecido em 0,303.

A figura 1 representa a média aritmética das DO dos animais infectados e do grupo negativo. Os animais infectados apresentaram um aumento nos

títulos de anticorpos a partir de 36 dias da infecção em todos os antígenos usados. O pico de anticorpos nos animais positivos foi entre 30 e 60 dias após a infecção (Figura 1). As DO individuais estão assinaladas na tabela 2.

Com a utilização de *C. bovis* e de *C. longicollis* como antígenos observa-se resultados similares com os do teste realizado com antígeno de *C. cellulosae*. Porém, com menor intensidade de reação. Em relação à intensidade de reação, verificou-se ser em ordem decrescente antígeno parcial de *C. cellulosae*, antígeno total de *C. bovis*, antígeno total de *C. longicollis*.

Aplicabilidade do teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-*C. bovis* em bovinos considerados negativos na inspeção de rotina.

Para avaliar a técnica de ELISA desenvolvida, tendo como antígeno *C. cellulosae*, e o "cut-off" estabelecido como absorvância de 0,303, foram colhidas em frigorífico 20 amostras de soro de animais considerados não portadores de cisticercos em inspeção normal. Dentre os 20 animais examinados sorologicamente, 10% apresentaram valores de absorvância acima do "cut-off" indicando a provável presença de cisticercos nos animais (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Através do teste imunoenzimático (ELISA) verificou-se que, após a infecção com ovos de *Taenia saginata*, os animais passaram a produzir anticorpos contra o referido parasito. A mudança progressiva dos valores de IgG, em bezerros infectados, coincide com os observados por HARRISON & SEWELL, (1981); GALLIE & SEWELL (1981); KAMANGA-SOLLO et al., (1987); KYVSGAARD et al., (1991); SMITH et al., (1991); HAYUNG et al. (1991a). BRANDT et al., (1992) detectaram anticorpos na sexta semana pós-infecção, porém, o nível foi crescente até 20 semanas, quando estes autores realizaram o abate dos animais. EMRE et al., (1997) detectaram resposta de anticorpos quatro semanas após a infecção quando os animais albergavam mais de 100 cisticercos vivos. As razões do aparecimento dos anticorpos em período variáveis poderiam ser o tempo necessário para que os antígenos usados no imunodiagnóstico sejam reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro. Ou ainda, pode refletir o tempo requerido pelos animais para elevar a resposta de anticorpos a níveis detectáveis pela prova de ELISA (HAYUNG et al., 1991)_b.

No presente experimento, não houve uma correlação entre o número de cistos recuperados e os valores de absorvância. ONYANGO-ABUJE et

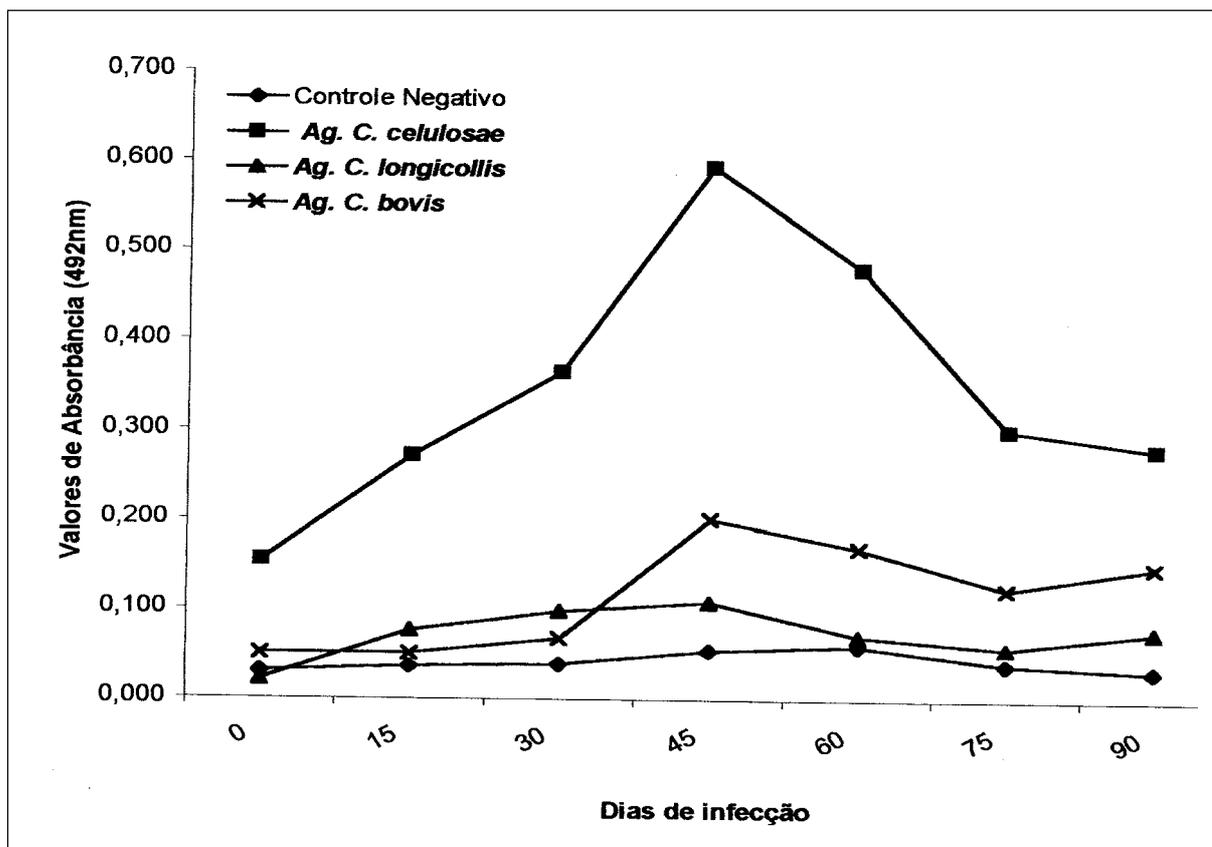


Figura 1- Cinética de produção de anticorpos contra - *Cysticercus bovis*, em bezeros infectados experimentalmente, frente a três antígenos: *C. celulosae*, *C. bovis* e *C. longicollis*. A produção de anticorpos foi avaliada pela técnica de ELISA com as condições ótimas padronizada no presente experimento. A cinética de anticorpos do grupo controle representada na figura foi realizada com o antígeno *C. celulosae*.

Tabela 2 - Valores de absorbância do soro de cada bezerro infectado com ovos de *Taenia saginata* durante o período de infecção frente ao antígeno de *Cysticercus celulosae* usando a técnica de ELISA. A escolha do antígeno foi feita por este ter apresentado os melhores resultados.

| Dias pós-infecção/Densidade óptica | | | | | | | |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Nº. dos animais | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90 |
| 1 | 0,067 | 0,156 | 0,448 | 0,717 | 0,458 | 0,421 | 0,336 |
| 3 | 0,244 | 0,338 | 0,303 | 0,604 | 0,76 | 0,335 | 0,402 |
| 4 | 0,133 | 0,256 | 0,223 | 0,437 | 0,648 | 0,327 | 0,476 |
| 9 | 0,154 | 0,249 | 0,196 | 0,394 | 0,284 | 0,151 | 0,145 |
| 466 | 0,048 | 0,189 | 0,364 | 1,169 | 0,739 | 0,521 | 0,432 |
| 426 | 0,056 | 0,103 | 0,205 | 0,342 | 0,44 | 0,226 | 0,213 |
| 416 | 0,231 | 0,469 | 0,877 | 1,101 | 0,672 | 0,504 | 0,334 |
| 457 | 0,289 | 0,523 | 0,666 | 0,872 | 0,585 | 0,499 | 0,359 |
| 475 | 0,121 | 0,626 | 0,383 | 0,459 | 0,313 | 0,321 | 0,205 |
| 498 | 0,035 | 0,059 | 0,17 | 0,202 | 0,137 | 0,067 | 0,048 |
| 401 | 0,156 | 0,280 | 0,486 | 0,610 | 0,651 | 0,429 | 0,343 |
| Média | 0,140 | 0,295 | 0,393 | 0,628 | 0,517 | 0,346 | 0,299 |

Tabela 3 - Valores de absorvância (densidade óptica) dos soros de bovinos, oriundos de abate em frigorífico e liberados como não portadores de cisticercos. Os soros foram colhidos e submetidos ao teste enzimoimunoensaio (ELISA) padronizado no presente trabalho com antígeno de *Cysticercus cellulosae* a 250ng/cavidade, soro diluído a 1/100 e conjugado a 1/400. O nível de corte entre reativos e não reativos estabelecido foi de 0,303

| Amostra | Absorbância | Amostra | Absorbância | Amostra | Absorbância |
|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|
| 01 | 0,051 | 08 | 0,089 | 15 | 0,130 |
| 02 | 0,057 | 09 | 0,094 | 16 | 0,132 |
| 03 | 0,069 | 10 | 0,099 | 17 | 0,140 |
| 04 | 0,077 | 11 | 0,108 | 18 | 0,164 |
| 05 | 0,077 | 12 | 0,112 | 19 | 0,323 |
| 06 | 0,082 | 13 | 0,113 | 20 | 0,442 |
| 07 | 0,086 | 14 | 0,124 | - | - |

al., (1996) também não observaram correlação entre a carga parasitária e o nível de anticorpos em animais natural e experimentalmente infectados. No bovino portador de apenas dois cistos calcificados, foi observado valor de absorvância de média intensidade, no período de 30 a 60 dias após a infecção, com valores mais baixos se comparados com aqueles obtidos nos bovinos portadores de maiores números de cistos, entretanto, foram superiores ao nível de corte (cut-off). Neste sentido, a principal dificuldade, com relação à sorologia para cisticercose bovina, é os baixos níveis de anticorpos em animais com infecções leves (HAYUNG et al., 1991.; KYVSGAARD et al., 1991; SMITH et al., 1991).

Estudos realizados, por vários autores, revelaram diferentes limiares de sensibilidade da prova de ELISA em função da carga parasitária. Para HAYUNG et al. (1991a), reação falso-negativa foi verificada em bovinos com até 83 cisticercos. Porém, posteriormente, os mesmos autores (HAYUNG et al. 1991b) encontraram um limiar de positividade para 12 cistos. Para KYVSGAARD et al., (1991), o limiar de positividade foi de 22 cisticercos. O fato de se ter encontrado um limiar de positividade com dois cisticercos, no presente experimento, deve-se provavelmente, pela análise ter sido realizada em bovinos infectados experimentalmente, os quais receberam 20.000 ovos, em desafio único. A intensidade da resposta imune pode ser diferente em infecções naturais, quando o animal recebe pequeno número de ovos.

Nos bovinos 03, 416, 457 e 475, após 15 dias da infecção, já era assinalada uma reatividade de média intensidade que se manteve por período curto. É provável que estes animais tenham anteriormente entrado em contato com antígenos que reagem de forma cruzada, tendo sido a resposta a dose desafio bastante rápida. KYVSGAARD et al. (1991)

observaram dados similares em bezerro intensamente infectado detectando anticorpos, a partir de uma semana pós-infecção.

Ao analisar a reatividade dos testes com os três antígenos, observa-se acentuada correlação, sendo nítida a presença de dois picos de anticorpos praticamente coincidentes, no mesmo espaço de tempo. Porém, com valores de absorvância em ordem decrescente para *C. cellulosae*, *C. bovis* e *C. longicollis*. Antígeno parcial de *C. cellulosae* e antígeno total de *C. bovis*, que são larvas morfológicamente semelhantes apresentaram densidades óticas mais próximas, o que reflete maior reatividade das estruturas constituintes do escólex, colo e pseudo-estróbilo. Todavia, em relação ao *C. longicollis*, que possui morfologia acentuadamente distinta, os valores de DO são mais distantes.

O teste de ELISA forneceu dados relevantes sobre o comportamento imunológico de bovinos portadores de cisticercose. O resultado da aplicação da técnica de ELISA em animais considerados negativos na inspeção demonstrou a presença de anticorpos, o que poderia significar que animais cisticercóticos poderiam estar escapando à metodologia de rotina. MINOZZO et al. (2002) observaram presença cisticercos, após inspeção por cortes paralelos, em animais considerados negativos na inspeção de rotina. O fato de os animais infectados desenvolverem anticorpos, mas, no curso da infecção, os níveis dos mesmos poderem cair abaixo do "cut-off", demonstra que o teste, no diagnóstico individual, poderia não detectar alguns animais em fase crônica. Porém, ao associar com a inspeção de rotina este poderia melhorar o controle da cisticercose. E, além de fornecer dados sobre o comportamento imunológico dos bovinos frente a cisticercose, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a possível aplicação do teste como ferramenta para estudos

epidemiológicos da parasitose e na identificação dos animais portadores de cistos. Animais que vão para o abate, com sorologia positiva, poderiam sofrer inspeção diferenciada. Teste sorológico positivo de bovinos nascidos e criados na mesma propriedade, sugere a presença de indivíduos portadores de teniose, entre aqueles que têm contato com os animais da propriedade. Assim, através da sorologia para cisticercose bovina, pode-se monitorar a prevalência da teniose humana. Repetidos exames do rebanho podem indicar o período de introdução da patologia na propriedade. Na compra de animais para engorda e posterior abate, a sorologia poderia ser uma ferramenta para detectar possíveis perdas futuras.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos: a Dra Adelaide Vaz, da USP pela doação do antígeno de *Cysticercus longicollis* e Dra Elaine Cogueti da Secretaria de Saúde do Município de Curitiba, pela coleta de proglotes de *Taenia* sp, ao IAPAR pela doação dos animais do experimento e ao CNPq pelo financiamento recebido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRANDT, J.R.A. et al. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **International Journal for Parasitology**, Kidlington, v.22, n.4, p.471-477, 1992.
- CHAPMAN, P.S. et al. Field evaluation in Botswana of a novel diagnostic test for *Taenia saginata* cysticercosis. **Herts, Royal Veterinary College Undergraduate Research Team**, v.6, n.4, p.353-355, 1998.
- COSTA, J.M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.44, n.1, p.15-31, 1986.
- EMRE, Z. et al. Studies on serodiagnosis of bovine cysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi**, v.21, n.6, p.471-476, 1997.
- ENCONTRO DO CONE SUL E SEMINÁRIO LATINOAMERICANO SOBRE TENÍASE E CISTICERCOSE (1:1994, Curitiba). **Anais Seminário Latino Americano de Teníase e Cisticercose**. Curitiba : Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, 1994. p.191.
- FLISSER A.; MADRAZZO I.; DELGADO H. **Cisticercosis humana**. México : Manual Moderno, 1997. 1-64p.
- ENGVALE E.; PERLMANN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunohistochemistry**, v.8, p.871, 1971.
- FREEMANN, R.S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v.40, p.969-990, 1962.
- GALLIE, G.J.; SEWELL, M.M.H. Inoculation of calves and adult cattle with oncospheres of *Taenia saginata* and their resistance to challenge infection. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v.13, p.147-154, 1981.
- GEMMELL, M. et al. **Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis and cysticercosis**. Genève : World Health Organization (WHO), 1983. p.23-107.
- HARRISON, L.J.S.; SEWELL, M.M.H. Antibody levels in cattle naturally infected with *Taenia saginata* metacestodes in Britain. **Research Veterinary Science**, London, v.31, p.62-64, 1981.
- HAYUNG, A. E.G. et al. Development of a serologic assay for cysticercosis, using an antigen isolated from *Taenia* spp cyst fluid. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.52, n.3, p.462-470, 1991a.
- HAYUNG, A.E.G. et al. Evaluation of a 'dipstick' immunoassay to detect cysticercosis in experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.38, p.13-22, 1991b.
- KAMANGA-SOLLO, E.I.P. et al. Evaluation of an antigenic fraction of *Taenia hidatigena* metacestode cyst fluid for immunodiagnosis. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.48, p.1206-1210, 1987.
- KYVSGAARD, N.C. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Taenia saginata* cysticercosis in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavia**, Vanlose, v.32, p.233-241, 1991.
- KOWALESKI W. **Incidência da cisticercose bovina no Estado do Paraná e aplicação da prova de ELISA como diagnóstico**. 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.
- LOWRY, H.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- MINOZZO J.C. et al. Experimental bovine infection with *Taenia saginata* eggs: recovery rates and cysticerci location. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.45, n.4, p.451-455, 2002.
- NAKANEPK.; KAWOI, A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. **Journal Histochemistry Cytochemistry**. v.22, n.12, p.1084-1091, 1974
- ONYONG-ABUJE, J.A. et al. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 61, n.3-4, p.331-230, 1996.
- OWEN R.R. The effectiveness of chemical disinfections on parasites in sludge. **Stabilisation and Disinfections of Sewage Sludge**, v.23, n.1, p.1-13, 1984.
- PAWLOWSKI, Z.S.; SCHULTZ, M.G. Taeniasis and Cysticercosis (*Taenia saginata*). **Advances in Parasitology**, London, v.10, p.269-343, 1972.
- PINTO, P.S.A. Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **Veterinary Parasitology**. v.88, p.127-130, 2000.
- SANTOS, I.F. Diagnóstico da cisticercose bovina em matadouros. **Higiene Alimentar**, v.7, n.25, p.26-34, 1993.

SMITH, H.J. et al. Serological diagnosis of cysticercosis by an enzyme-linked immunosorbent assay in experimentally infected cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.55, n.3, p.274-276, 1991.

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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.30, n.1, p.1-10, 1988.

VAZ, A.J. *Cysticercus longicollis* caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana. 1993. 100f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

WALTER, M.; KOSKE, J.K. *Taenia saginata* cysticercosis: a comparison of routine meat inspection and carcass dissection results. **Veterinary Record**, London, v.106, p.401-402, 1980.