

VALTER DA SILVA QUEIROZ

**ENZIMOIMUNOENSAIO (ELISA), IMUNOELETRORANSFERÊNCIA
(EITB) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
(HPLC), COMO FERRAMENTAS PARA DIAGNÓSTICO DE
FASCIULOSE HEPÁTICA EM BUBALINOS (*Bubalus bubalis*
LINAEUS, 1758)**

CURITIBA

2005

VALTER DA SILVA QUEIROZ

**ENZIMOIMUNOENSAIO (ELISA), IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA
(EITB) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
(HPLC), COMO FERRAMENTAS PARA DIAGNÓSTICO DE
FASCIULOSE HEPÁTICA EM BUBALINOS (*Bubalus bubalis*
LINAEUS, 1758)**

Tese apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Processos Biotecnológicos
Setor de Tecnologia, Universidade Federal
do Paraná como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor, Área de
concentração: Saúde Animal e Humana.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz
Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Ennio Luz

CURITIBA

2005

QUEIROZ, Valter da Silva.

Enzimoimunoensaio (elisa), imunoeletrotransferência (eitb) e cromatografia líquida de alta eficiência (hplc), como ferramentas para diagnóstico de fasciolose hepática em bubalinos (*Bubalus bubalis* lineaeus, 1758). 2005
109 f.

Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

1. Enzimoimunoensaio. 2. Imunoeletrotransferência. 3. Cromatografia líquida.
4. Bubalinos. 5. *Fasciola hepatica*.

VALTER DA SILVA QUEIROZ

**ENZIMOIMUNOENSAIO (ELISA), IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA (EITB) E
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC), COMO
FERRAMENTAS PARA DIAGNÓSTICO DE FASCIULOSE HEPÁTICA EM
BUBALINOS (*Bubalus bubalis* LINAEUS, 1758)**

Tese julgada e aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos no Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, de de 2005

Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Coordenadora do Programa

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Vanete Thomaz Soccol

Prof. Dr. Ennio Luz

Profª Drª Edilene Alcântara de Castro

Prof. Dr. Germano Francisco Biondi

Prof. Dr. Metry Bacila

Dedico este trabalho

Aos meus filhos, Rocksom Matheus Queiroz e Rafael Gustavo Queiroz.

À minha esposa, Ieda de Fátima Camargo Queiroz.

À minha mãe, Célia Barbosa da Silva Queiroz.

À memória de meu pai, Carlos dos Santos Queiroz.

À memória dos meus avós Alice Boaretto Barbosa e José Barbosa da Silva.

À memória do professor Heitor Guilherme Segundo Medina.

Ao professor Metry Bacila.

À minha orientadora professora Dra. Vanete Thomaz Soccol.

Ao meu co-orientador professor Dr. Ennio Luz.

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, meu companheiro de todas as horas.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR) pela liberação da carga horária e pelo incentivo à realização do curso.

Aos alunos: Paula Mayumi Ono, Stephanie C. Alberti, Luis Arthur F. Tramujas, Carlos Alberto G. Bretaña, Raquel Szygalski Biasi, Karine Reiter, Rafael Mann Filus de Oliveira e Simone Pasko por toda a ajuda prestada em nosso laboratório de campo e pelo privilegio da convivência, jamais os esquecerei.

Aos funcionários: Hélio Massao Isobe, Elizabeth Roper, Rafaeli Leschnhak, Paulo Jorge Sizanowski, Luciano Nicanor de Arruda e Leandro César Teixeira.

Aos professores: Felipe Paulino de Figueiredo Wouk; Sílvio Péllico Neto; Rodrigo Távora Mira, Luis Carlos Leite, Silvana Maris Cirio, José Luis Moreira e Silvia Schimidlin Keil.

À bibliotecária Lucieli Ianino Silva.

Ao LACEN/PR pela liberação da carga horária e disponibilização do cromatógrafo.

Aos funcionários: Alfredo Benatto, Sonia Regina Woitkoski, Ana Luisa Conter Borges, Ingrid Vanessa , Daniel Altino de Jesus, Marvina Matsue Imoto, Konetsugu Higashiyama, e Silvana Bosquioli.

Ao José da Hexis, que gentilmente conseguiu a doação da coluna cromatográfica com a qual pude realizar as cromatografias.

A Rubens Ferreira Gusso, diretor do CPPI pela disponibilização dos coelhos, materiais e biotério para a produção do soro hiper-imune.

Ao curso de pós-graduação em Processos Biotecnológicos.

Ao professor João Carlos Minozzo pelos ensinamentos sobre a técnica de ELISA e sua padronização, pelo fornecimento de antígenos de diversos parasitos e soro hiperimmune anti-Ag total de *Fasciola hepatica*, pelos ensinamentos sobre a imunização dos coelhos e técnicas de punção venosa e cardíaca e pelo acompanhamento em vários momentos do trabalho.

À professora Rosângela Paulino.

À Regiane Sargick pelo desprendimento e paciência em me ensinar a técnica de imunoeletrtransferência.

À Juliana Tracks Pereira e Luciane Hennig, por todo o auxílio prestado.

Aos professores João Maria Ferraz Diniz e Homero Rogério Arruda Vieira.

Ao meu amigo Marcos Traad da Silva por todo o apoio prestado.

Aos médicos veterinários e funcionários do frigorífico Argus.

À SPVS e ao IAPAR pela permissão da coleta de moluscos nas suas propriedades

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	6
2.1 OBJETIVOS GERAIS	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA	8
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 SELEÇÃO DAS POPULAÇÕES	30
4.2 OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE <i>Fasciola hepatica</i> E ANTÍGENOS TOTAIS DE <i>Fasciola hepatica</i> E <i>Euritrema coelomaticum</i>	31
4.2.1 Produção do Antígeno de Secreção/Excreção de <i>Fasciola hepatica</i> FhSE	31
4.2.2 Produção de Antígeno Total de <i>Euritrema coelomaticum</i>	32
4.2.3 Obtenção de Antígenos Totais de <i>Fasciola hepatica</i> e <i>Ascaris suum</i> e de Soro Hiperimune Contra o Antígeno Total de <i>Fasciola hepatica</i>	32
4.3 OBTENÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI-ANTÍGENO DE SECREÇÃO/ EXCREÇÃO DE <i>Fasciola hepatica</i>	32
4.4 ENZIMOIMUNOENSAIO - ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA): PRINCÍPIO E FLUXOGRAMA DA REALIZAÇÃO PRÁTICA	33
4.4.1 Padronização da Técnica ELISA e Verificação da Resposta Imune no Soro Policlonal de Coelhos Imunizados com Antígeno de Secreção e Excreção de <i>Fasciola hepatica</i>	34
4.4.2 Cinética de Produção de Anticorpos.....	36
4.5 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE MÍNIMA DE ANTÍGENO FHSE DETECTADA PELO SORO HIPERIMUNE DE COELHO ANTI- FhSE	36
4.6 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA ELISA PARA A PESQUISA DE COPROANTÍGENOS EM BUBALINOS PORTADORES DE <i>Fasciola hepatica</i>	36
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA NO DIAGNÓSTICO DA FASCIULOSE HEPÁTICA EM BUBALINOS.....	37
4.8 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PRESENTES NOS ANTÍGENOS TOTAIS DE <i>Fasciola hepatica</i> E <i>Euritrema coelomaticum</i> , NO ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE <i>Fasciola hepatica</i> , E NOS EXTRATOS DE FEZES DE BUBALINOS COM <i>Fasciola hepatica</i> E DE BOVINOS COM <i>Euritrema</i> <i>coelomaticum</i>	38

4.9	IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA (EITB)	40
4.10	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	41
5	RESULTADOS	43
5.1	PADRONIZAÇÃO DO ENZIMOIMUNOENSAIO	43
5.2	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O ANTÍGENO FhSE	44
5.3	PESQUISA DE ANTÍGENO	45
5.3.1	Pesquisa de Coproantígenos	45
5.3.2	Determinação do Nível de Corte da Reação entre Animais Positivos e Negativos	47
5.3.3	Pesquisa de Coproantígenos de Secreção/Excreção de <i>Fasciola hepatica</i> FhSE em Bubalinos	48
5.3.4	Pesquisa de Coproantígenos de <i>Fasciola hepatica</i> em Rebanhos de Diferentes Prevalências de Parasitose (População 4).....	50
5.4	IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA	51
5.4.1	Perfil Eletroforético das Proteínas Presentes no Antígeno Total de <i>Fasciola hepatica</i> e no Antígeno de Secreção/Excreção (FhSE) do Parasito.....	51
5.4.2	Perfil Eletroforético, das Proteínas Presentes nos Antígenos Totais <i>F. hepatica</i> e <i>E. coelomaticum</i> , no Antígeno de Secreção/Excreção de <i>F. hepatica</i> , e nos Extratos de Fezes de Bubalinos com <i>F. hepatica</i> e de Bovinos com <i>E. coelomaticum</i>	52
5.4.3	Identificação, Mediante Imunoeletrotransferência, das Frações Antigênicas Presentes nos Antígenos Totais de <i>Fasciola hepatica</i> , e <i>Euritrema coelomaticum</i> , e nos Extratos de Fezes de Bubalinos com <i>Fasciola hepatica</i> e Bovinos com <i>Euritrema coelomaticum</i> Reconhecidas pelo Soro de Coelho Hiperimune Anti-Antígeno Total e Anti-Antígeno de Secreção/Excreção de <i>Fasciola hepatica</i>	54
5.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	56
5.5.1	Comparação, Mediante a Utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultra Violeta (UV), dos Perfis Cromatográficos dos Antígenos Obtidos de <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Euritrema coelomaticum</i> e <i>Ascaris suum</i>	56
5.5.2	Comparação entre os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência, resultados do teste ELISA e da inspeção federal, no diagnóstico da fasciolose hepática em bubalinos.	58
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	66
8	PERSPECTIVAS	67
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICES	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO	35
FIGURA 2 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE IgG CONTRA <i>Fasciola hepatica</i> EM COELHOS	44
FIGURA 3 - PESQUISA DE COPROANTÍGENO DE <i>Fasciola hepatica</i> EM FEZES DE BUBALINOS USANDO POOL DE FEZES DE ANIMAIS POSITIVOS E POOL DE FEZES DE ANIMAIS NEGATIVOS FRENTE AO SORO HIPERIMUNE DE COELHOS CONTRA ANTÍGENO DE SECREÇÃO E EXCREÇÃO DE <i>F. hepatica</i>	46
FIGURA 4 - PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA USANDO EXTRA DE FEZES DE BUBALINOS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA A PESQUISA DE COPROANTÍGENOS DE <i>Fasciola hepatica</i> UTILIZANDO SORO ANTÍ-ANTÍGENO TOTAL DO PARASITO	47
FIGURA 5 - DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CORTE ENTRE ANIMAIS REAGENTES DE NÃO REAGENTES <i>CUT OFF</i>	48
FIGURA 6 - ABSORBÂNCIA VERIFICADA MEDIANTE PESQUISA DE COPROANTÍGENOS POR TESTE ELISA, COM ANTICORPO CONTRA ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE <i>Fasciola hepatica</i> , EM BUBALINOS COM MAIS DE 20 EXEMPLARES DE <i>F. hepatica</i> ADULTOS NO FIGADO E 20 BUBALINOS SEM <i>F. hepatica</i>	49
FIGURA 7 - ABSORBÂNCIA VERIFICADA NA PESQUISA DE COPROANTÍGENOS, POR TESTE ELISA, COM ANTICORPO POLICLONAL, EM AMOSTRAGEM DE FEZES DE 220 BUBALINOS, COLETADA EM FRIGORÍFICO	50
FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ANTÍGENOS DE <i>Fasciola hepatica</i> (AG TOTAL FHE AG FHSE), E EXTRATO DE FEZES DE BUBALINOS COM <i>F. hepatica</i> (FF) E DOS MARCADORES: SOROALBUMINA BOVINA (BSA) E SDS7	51
FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE ANTÍGENOS DE <i>Fasciola hepatica</i> (ANTÍGENO TOTAL - FT), <i>Fasciola hepatica</i> (ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO - FS/E), E <i>Euritrema coelomaticum</i> - EU, E EXTRATOS DE FEZES DE BUBALINOS COM <i>Fasciola hepatica</i> - FF, E DE BOVINOS COM <i>Euritrema coelomaticum</i> - FEU, COMPARADOS COM O MARCADOR DE PESO MOLECULAR SDS 7 E A SOROALBUMINA BOVINA - BSA, EM GEL DE POLIACRILAMIDA	52
FIGURA 10 - RESULTADO DA TRANSFERÊNCIA DOS ANTÍGENOS DE <i>Euritrema coelomaticum</i> - EU, <i>Fasciola hepatica</i> (ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO FS/E E ANTÍGENO TOTAL FT) PARA A NITROCELULOSE, CORADO PELO PONCEAU'S	53

FIGURA 11 - PROTEÍNAS DE <i>Fasciola hepatica</i> (FT), E <i>Euritrema coelomaticum</i> (EU), REVELADAS PELO SORO HIPERIMUNE ANTI-ANTÍGENOS TOTAL -(T), E DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO - (S/E) DE <i>Fasciola hepatica</i> , NOS ANTÍGENOS (EU E FT), DE ANIMAIS PARASITADOS	54
FIGURA 12 - COPROANTÍGENOS DE <i>Euritrema coelomaticum</i> E <i>Fasciola hepatica</i> REVELADOS MEDIANTE EITB COM SORO HIPERIMUNE ANTÍGENO FHSE.....	55
FIGURA 13 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ANTÍGENOS DE <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Euritrema coelomaticum</i> , E <i>Ascaris suum</i> (COMPARÁVEL AO <i>Neoascaris vitolorum</i>)	57
FIGURA 14 - CROMATOGRAMAS DE ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE <i>Fasciola hepatica</i> FHSE, DENOMINADO PADRÃO PROT1, COMPARADO COM O CROMATOGRAMA DO ANTÍGENO TOTAL DO PARASITO	58
FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE FEZES DE TRÊS BUBALINOS POSITIVOS PARA <i>Fasciola hepatica</i> À INSPEÇÃO E QUE MOSTRARAM ALTA REATIVIDADE (POSITIVIDADE) NO TESTE ELISA	59
FIGURA 16 - CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE FEZES DE TRÊS BUBALINOS POSITIVOS PARA <i>Fasciola hepatica</i> À INSPEÇÃO E QUE MOSTRARAM MÉDIA REATIVIDADE (POSITIVIDADE) NO TESTE ELISA	60
FIGURA 17 - CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE FEZES DE TRÊS BUBALINOS NEGATIVOS PARA <i>Fasciola hepatica</i> À INSPEÇÃO E QUE MOSTRARAM BAIXA REATIVIDADE (NEGATIVIDADE) NO TESTE ELISA	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DILUIÇÕES DOS EXTRATOS DE FEZES PARA PESQUISA DE COPROANTÍGENOS DE <i>Fasciola hepatica</i> POR ENZIMOIMUNOENSAIO	37
TABELA 2 - ÍNDICES PARA AFERIÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE ELISA COMPARANDO COM O PADRÃO DE REFERÊNCIA: RESULTADO DA INSPEÇÃO FEDERAL	38
TABELA 3 - DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS EM TAMPÃO DE AMOSTRA	40
TABELA 4 - ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA O ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE <i>Fasciola hepatica</i> RECONHECIDO PELO SORO DE COELHO IMUNIZADO COM O ANTÍGENO FHSE	43
TABELA 5 - PERÍODO DE IMUNIZAÇÃO E SANGRIAS REALIZADAS	44
TABELA 6 - QUANTIDADE MÍNIMA DE ANTÍGENO FHSE DETECTADA PELO SORO DE COELHO IMUNIZADO COM O ANTÍGENO FHSE.....	45

RESUMO

No presente trabalho padronizou-se uma técnica de enzimo-imuno-ensaio ELISA indireto para detecção de coproantígenos de *Fasciola hepatica* LINNAEUS, 1758 nas fezes de *Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758. Num primeiro tempo foram produzidos anticorpos policlonais contra o antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* em coelhos. Após a padronização, o referido teste foi aplicado a 40 bubalinos, 20 dos quais eram portadores de *Fasciola hepatica* adultas no fígado (20 exemplares ou mais) e 20 deles negativos. A sensibilidade do teste foi de 95% e a especificidade 100%. O padrão ouro utilizado foi a observação do parasito adulto nos ductos biliares por exame de inspeção em frigorífico e a detecção de ovos do parasito pela técnica dos quatro tamises (GIRÃO e UENO, 1985). A pesquisa de coproantígeno com os anticorpos policlonais quando aplicada em 220 bubalinos procedentes de vários rebanhos, apresentou uma sensibilidade de 68% e uma especificidade de 96%. Compararam-se os perfis eletroforéticos do antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* do antígeno total de *F. hepatica*, e de *Euritrema coelomaticum* GIARD et BILLET, 1892, demonstrando que os mesmos são diferentes. Foi também aplicada a técnica de imunoeletrotransferência com os antígenos totais de *Fasciola hepatica* e *Euritrema coelomaticum*, e com extratos de fezes de bubalinos com *F. hepatica* e bovinos com *E. coelomaticum*, frente ao anticorpo policlonal (anti-antígeno total e anti-antígeno de secreção/excreção de *F. hepatica*). A referida técnica permitiu diferenciar tanto os antígenos obtidos dos extratos dos parasitos, quanto os coproantígenos. Utilizando-se de uma técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, obtiveram-se os perfis cromatográficos dos extratos totais de *F. hepatica*, *E. coelomaticum* e *Ascaris summ* GOEZE, 1782, os quais revelaram ser diferentes entre si. Pela referida técnica, foram examinados extratos de fezes de seis bubalinos com resultado do teste ELISA positivo e três animais com resultado do teste ELISA negativo, comparando com o padrão o antígeno de secreção/excreção (FhSE) o mesmo perfil cromatográfico foi reconhecido nos animais com pesquisa de coproantígeno positiva e não foi detectado nos animais com pesquisa de coproantígeno negativa, o que demonstra que esta metodologia pode ser aplicada para o diagnóstico da fasciolose hepática.

Palavras-chave: enzimoimunoensaio; imunoeletrotransferência; cromatografia líquida; bubalinos; *Fasciola hepatica*.

ABSTRACT

In the current work we standardized an indirect technique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection antigens of *Fasciola hepatica* LINNAEUS, 1758, in the feces of *Bubalus bubalis* LINNAEUS, 1758. Initially, antibodies policlonais against the antigen of the secretion/excretion of *Fasciola hepatica* in rabbits were developed. Following the standardization, the above test was applied to 40 buffaloes, of wich 20 were carriers of mature *Fasciola hepatica* in their livers (20 or + liver flukes) and 20 were negative. The sensitivity of this test was 95% and the specificity 100%. The gold standard was observation of the adult parasite in the billiar ducts by examining especimens at the slaughterhouse, and the detection of the parasite ova, by 4 metallic sifters (GIRÃO E UENO, 1985). Research of coproantigens with policlonais antibodies when applied to 220 bubalinos from several herds, demonstrated a 68% sensibility and a 96% especificity. Profiles electroforesis of antigens of secretion/excretion of *Fasciola hepatica*, of the complete antigen of *Fasciola hepatica*, of *Eutitrema coelomaticum* GIARD ET BILLET, 1892 were compared and were determined to be different from one another. Also applied was technique of imunoelectrotransference-blot (EITB) with all antigens obtained from *Fasciola hepatica*, *Euritrema coelomaticum* and with extracts of feces from buffaloes with *Fasciola hepatica* and cattle with *Euritrema coelomaticum*, relative to the policlonal antibody (total anti-antigen and anti-antigen from the secretion/excretion of *Fasciola hepatica*). This technique allowed the diferenciacion of the antigens obtained from the parasites as well as of the coproantigens. Employing a high performance liquid chromatography (HPLC), chromatografic profiles were obtained of *Fasciola hepatica*, *Euritrema coelomaticum* e *Ascaris suum* GOEZE, 1982, wich were shown to be totally different from each other. Using the technique above to analyse the feces extracts of six buffaloes with positive results from the ELISA test and three animals with negative results from the ELISA test, employing as a standard the secretion/excretion antigen (FhSE), the same results was obtained from the ELISA positive animals and not from the ELISA negative animals, which demonstrates this methodology may be applied to diagnose *Fasciola hepatica*.

Key-words: enzyme-linked immunosorbent assay; imunoelectrotransference-blot; high performance liquid chromatography; buffaloes; *Fasciola hepatica*.

1 INTRODUÇÃO

A fasciolose hepática é uma zoonose causada por um Trematoda: Fasciolidae, *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, que acomete o fígado e as vias biliares de muitas espécies de animais domésticos, selvagens e o próprio homem. A verminose causa grande prejuízo econômico à pecuária mundial. Este se deve à condenação de grande número de fígados nos matadouros além da queda na produção e na qualidade do leite, perda de peso dos animais, queda na fertilidade, atraso no crescimento, e, podendo ocasionar até mortalidade. No homem a fasciolose pode desenvolver um quadro clínico grave (LUZ *et al.*, 1996). Além do hospedeiro vertebrado, a *Fasciola hepatica* necessita para se desenvolver de hospedeiros intermediários, representados por moluscos Pulmonata do gênero *Lymnaea* (LUZ *et al.*, 1992).

Diferentes autores descrevem a fasciolose nos animais, destacando a infecção em ovinos e bovinos classicamente reconhecidos pelos trabalhos de NEVEU LAMAIRE (1936); CRAIG e FAUST (1945); PIEKARSKI (1959); EUZEBY, na França, (1971); CHIRIBOGA *et al.*, Porto Rico (1974); FAUST (1974); SUAZO *et al.*, México (1989). No Brasil: REZENDE *et al.*, no Rio de Janeiro (RJ) (1973); GOMES *et al.*, (RJ) (1974); AMATO *et al.*, (1982); VERONESI (1985); SERRA FREIRE *et al.*, (1995) que fez uma revisão dos trabalhos realizados por pesquisadores no Rio de Janeiro e em São Paulo (SP), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR), MATTOS *et al.* em SC, PR, e SP (1997). No Paraná GIOVANNONI e KUBIAK (1947); FERNANDES (1965); BUSETTI *et al.* (1983); FERNANDES e HAMANN (1985); LUZ *et al.* (1992), LUZ *et al.* (1992, 1994, 1996), BOSTELMANN *et al.* (2000) e QUEIROZ *et al.* (2002).

Em bubalinos, no litoral do Paraná - Brasil, a parasitose foi estudada por BUSETTI *et al.*, (1981) BUSETTI (1983), FERNANDES *et al.* (1985) e BOSTELMANN (2000). No Rio de Janeiro PILE *et al.* (2001) citam ser a primeira vez que a referida

parasitose é encontrada naquele Estado.

Várias técnicas têm sido utilizadas para o diagnóstico desta importante parasitose, dentre elas destacam-se as técnicas diretas e indiretas. A técnica direta, mais simples, é a observação do parasito adulto nos ductos biliares dos animais mediante necrópsia e inspeção pos morte. Esta técnica foi considerada o padrão ouro para o presente trabalho. Nas demais técnicas diretas, o objetivo é colocar em evidência o ovo do parasito (exame coproparasitológico). No início do século XX foram desenvolvidas técnicas baseadas no princípio de sedimentação fecal de HOFFMANN¹, *et al.* (1934). Todavia, estas técnicas têm baixa sensibilidade e são capazes de colocar em evidência a parasitose apenas após o parasito ter completado o ciclo. Nos anos 80 GIRÃO e UENO (1985) padronizaram a técnica de tamização para a pesquisa de ovos. Todavia, apesar de melhor sensibilidade, a técnica só é capaz de detectar ovos após o parasito ter migrado pelo parênquima hepático. A comprovação pode ser constatada no trabalho de MARTINEZ *et al.* (1996) que detectam ovos do parasito nas fezes, de 100% de cabras infectadas experimentalmente, após 60 a 90 dias da infecção.

As técnicas indiretas foram desenvolvidas a partir dos anos 90 e pesquisam anticorpos produzidos contra qualquer fase do parasito, ou, podem ainda, pesquisar antígenos parasitários. As técnicas de pesquisa de anticorpos mais utilizadas até o presente são Imunofluorescência indireta, imunoeletrotransferência (EITB), radioimunoensaio e a técnica de diagnóstico imunoenzimático denominada ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) que se caracterizam por alta sensibilidade, especificidade, rapidez e economia. Na maioria de suas aplicações a técnica ELISA é comparável e até superior às técnicas de diagnóstico, anteriormente citadas. Dentro de suas possibilidades de aplicação se destaca no campo da Parasitologia, Virologia,

¹ A técnica foi descrita primeiro por Lutz em 1919, e depois por Hoffmann *et al.* em 1934, mas ficou conhecida com o nome de técnica de Hoffmann, Pons e Janer.

Imunopatologia, entre outras. Uma das grandes vantagens que apresenta é a possibilidade de estudar grandes populações em um curto prazo, sem precisar de instalações caras (ZUBIETA, 2003).

Assim, entre as técnicas diretas a que apresenta maior sensibilidade é a técnica dos quatro tamizes de GIRÃO e UENO (1985), porém, tem como inconveniente, a necessidade de examinar uma amostra de cada vez. Depende de técnico especializado e de repetições, caso os primeiros exames dêem resultados negativos, para se ter certeza da negatividade. Detecta apenas ovos, o que significa que a doença precisa estar no estado patente para ser detectada, ou seja, já tendo causado lesões e conseqüentemente, prejuízos.

A pesquisa de anticorpos no soro sangüíneo pela técnica de ELISA indireta, embora indique se o animal teve contato com o parasito, não permite saber com certeza se a doença está em curso ou se já foi debelada. Entretanto, em animais acompanhados sorologicamente, permite a detecção do parasito ainda no período pré-patente.

Os anticorpos séricos são detectados no início da infecção. Em estudo, mediante a técnica de ELISA com antígeno SE de *Fasciola hepatica* da cinética de produção de anticorpos por ratos infectados experimentalmente DÍAZ *et al.* (1998) detectaram 80% dos animais com anticorpos já na 2ª semana pós-infecção e 100% na 3ª semana. FREDES *et al.* (2001) estudando ovinos infectados por *Fasciola hepatica* mediante EITB, utilizando antígenos de *Fasciola hepatica* purificados por electroeluição, constataram o reconhecimento de um antígeno de 29 kDa a partir da 6ª semana de infecção e um de 14 kDa a partir da 8ª semana. Os referidos anticopos perduram ao longo do período da infecção, como o encontrado por MARTINEZ *et al.*, (1996) 365 dias após a infecção experimental em cabras. Os anticorpos perduram também por um certo tempo após a cura da doença. ESPINO *et al.* (1994), realizando teste ELISA com

Anticorpo Monoclonal ES78 para a detecção de anticorpos no soro em seres humanos pós-tratamento com drogas fasciolicidas, constataram que decorridos dois meses pós-tratamento, de 14 pacientes tratados, 11 já não apresentavam ovos do parasito nas fezes e também não apresentaram anticorpos detectáveis pelo teste ELISA, e três apresentaram positividade para ambos os testes.

O conjugado anti-bubalino não é de acesso fácil no Brasil, e o conjugado anti-bovino não funciona para bubalinos, de forma que uma pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo por ELISA direto necessitaria que se fizesse o conjugado correspondente.

A pesquisa de coproantígenos do parasito permite detectar a doença ativa, ou seja, a presença do parasito vivo causando a doença, possibilitando estudar a incidência e a prevalência da mesma em um rebanho. O conhecimento epidemiológico é muito importante para instituir-se um esquema terapêutico e outras medidas estratégicas para o controle da mesma. Outra vantagem em relação ao exame sorológico, é que a coleta de material para pode ser realizada de forma não invasiva para os animais e sem por em risco a segurança do pesquisador.

Os antígenos de secreção e excreção têm a sua produção limitada ao número de parasitos presentes no hospedeiro e, uma vez eliminados os parasitos, cessa a produção e a detecção de antígenos.

Na revisão bibliográfica realizada não foi encontrado nenhum trabalho que tratasse de testes para a pesquisa de coproantígenos de *Fasciola hepatica* em bubalinos, apesar de se observar trabalhos que reportam bons resultados deste tipo de teste para bovinos (CASTRO *et al.*, 1994), ovinos (DUMÉNIGO *et al.*, 1998, 1999) e para o homem (ESPINO *et al.*, 2000). Pelo fato da referida parasitose ser endêmica em nossa região e apresentar os problemas de diagnóstico, acima citados, buscou-se desenvolver os referidos testes.

Para as técnicas de ELISA e imunoeletrotransferência, optamos por trabalhar

com anticorpos policlonais, buscando desenvolver uma técnica compatível com as condições nacionais.

Quanto à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foi desenvolvida no intuito de testar a hipótese de se utilizar uma metodologia rápida e de alta eficiência para a detecção de proteínas de secreção e excreção encontradas nas fezes dos animais portadores de *Fasciola hepatica* e com possibilidade de aplicação em seres humanos.

Dois parasitos são de ocorrência comum em bovinos existentes na região de procedência dos animais estudados, um deles é o Trematoda *Euritrema coelomaticum*, e o outro, o nematoda *Neoascaris Vitullorum*. Como eles são parasitos também de bubalinos, foram incluídos no presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivos desenvolver técnica de ELISA indireta para diagnóstico de *Fasciola hepatica* pela pesquisa de coproantígenos em búfalo, *Bubalus bubalis* LINAEUS, 1758 e verificar a possibilidade de evidenciar os referidos coproantígenos pelas técnicas de imunoeletrotransferência (EITB) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a cinética de produção de anticorpos para o antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* (FhSE), utilizando a prova de ELISA indireta;
- b) Padronizar a técnica de ELISA para a pesquisa de coproantígenos em bubalinos;
- c) Pesquisar coproantígenos de secreção/excreção de *F. hepatica* (FhSE) em fezes de bubalinos;
- d) Determinar a sensibilidade e a especificidade do teste de ELISA no diagnóstico de fasciolose hepática em bubalinos;
- e) Determinar o perfil eletroforético de proteínas presentes:
 - nos antígenos totais de *F. hepatica* e *Euritrema coelomaticum*;
 - no antígeno de secreção/excreção de *F. hepatica*, e,
 - nos extratos de fezes de bubalinos com *F. hepatica* e com *E. coelomaticum*;

- f) Identificar, mediante imunoeletrtransferência as frações antigênicas presentes nos antígenos totais de *F. hepatica* e *Euritrema coelomaticum* e nos extratos de fezes de bubalinos com *F. hepatica* e bovinos com *Euritrema coelomaticum* reconhecidos pelo soro de coelho hiperimmune anti-antígeno total e de secreção/excreção de *F. hepatica*.
- g) Determinar por HPLC, o perfil cromatográfico das proteínas presentes nos antígenos totais de *F. hepatica*, *E. coelomaticum*, *Ascaris suum* e no antígeno de secreção/excreção de *F. hepatica*;
- h) verificar cromatograficamente a presença de antígenos de *F. hepatica* nas fezes de bubalinos parasitados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A fasciolose hepática é uma doença parasitária cosmopolita que atinge o fígado de mamíferos domésticos, silvestres (COURTIN *et al.*, 1979), e do homem. Seu agente etiológico pertence ao filo Platyhelminthes da ordem Trematoda, da classe Digenea espécie *Fasciola hepatica*. É um parasito com um formato de folha, de coloração rosada, que mede quando adulto, aproximadamente 3 a 5 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura. O parasito é hermafrodita, podendo, para reproduzir-se fazê-lo por auto-fecundação ou fecundação cruzada. Seu aparelho digestivo é incompleto. Ele apresenta duas ventosas para a fixação e espículos em sua cutícula de revestimento.

Quando adulto, o parasito se localiza no interior dos ductos biliares do fígado, normalmente nos de médio e pequeno diâmetro, onde fica enrolado, podendo causar obstrução. A presença do parasito causa espessamento e calcificação dos ductos. O parasito produz ovos operculados que medem 80 µm por 150 µm, e que devido à bile ficam com uma coloração castanho-amarelada característica. Os ovos vão ter ao intestino delgado, sendo que, no animal parasitado é grande a quantidade destes encontrada na vesícula biliar. Os referidos ovos são eliminados ao meio ambiente juntamente com as fezes, onde, em condições ideais de temperatura e umidade eclodem em aproximadamente 9 a 15 dias, liberando através do opérculo uma larva ciliada denominada miracídio, que nada rapidamente até encontrar um molusco do gênero *Lymnaea*, hospedeiro intermediário do parasito. O miracídio é muito frágil, e morre em poucas horas se não encontrar o hospedeiro intermediário. Ele penetra ativamente atravessando o epitélio de revestimento das partes moles do molusco, e, em sua musculatura, forma uma estrutura denominada esporocisto que ao evoluir libera células que migram ao hepato-pâncreas do molusco onde se transformam em rédias, estas por sua vez, ao encontrar condições adversas, darão origem a rédias filhas e netas, retardando assim o processo evolutivo, mas em contrapartida aumenta o número

de parasitos. No interior de cada rédia formam-se então várias cercárias, que apresentam uma cauda e duas ventosas. Estas abandonam o molusco e nadam no meio líquido até encontrarem uma superfície para se fixar, podendo esta ser uma folha vegetal. Após a fixação, elas formam uma membrana cística e assumem uma forma resistente, infectante, denominada metacercária. A metacercária pode resistir por até um ano no meio ambiente. O ciclo, no interior do caramujo dura de 30 a 45 dias. Os hospedeiros definitivos do parasito se infectam ao ingerirem plantas contaminadas com metacercárias. Estas, ao atingirem o intestino delgado perdem a membrana cística, transformando-se em distômulos, que atravessam a parede do intestino, se deslocam pelo peritônio e atravessam a cápsula de Glisson do fígado, migrando pelo parênquima hepático por cerca de seis semanas, até atingirem um ducto biliar, onde após cerca de quatro semanas estão maduras e começam a produzir ovos, iniciando assim, um novo ciclo (DUNN, 1983; VERONESI, 1985; DUMÉNIGO *et al.*, 1999; URQUHART *et al.*, 2001).

Abaixo de 10° C, o molusco deixa de se reproduzir e hiberna, nesta temperatura, as formas larvárias do parasito também suspendem a sua evolução.

O molusco do gênero *Lymnaea* é da ordem pulmonata, precisando do ar atmosférico para respirar, ele habita coleções de água corrente ou parada, podendo viver em rios, córregos, lagos, tanques, banhados, poças de água, depressões causadas pelas pegadas dos animais e nas pastagens, se estas apresentarem umidade suficiente. Ele é anfíbio, habitando normalmente a interface entre a superfície da água e o ar. Ele se alimenta normalmente de algas e vegetais decompostos. É hermafrodita e deposita seus ovos normalmente na superfície inferior de objetos flutuantes, formando uma massa gelatinosa que se adere ao objeto. Quando a umidade do ambiente diminui, ele se enterra na lama e hiberna, podendo assim permanecer por longos períodos. O molusco pode ser levado a grandes distâncias aderido à plantas flutuantes, que se deslocam nos rios principalmente durante a época das chuvas, colonizando assim

novos ambientes, seguindo a malha hidrográfica da região.

A fasciolose tem diferentes formas de apresentação, associadas à quantidade e frequência de ingestão de metacercárias pelo hospedeiro (ROJAS, 1990). Também existem diferenças quanto à capacidade infectante dos parasitos, dependente das condições ambientais que tenham suportado em seu desenvolvimento no molusco e ao encistar-se nos vegetais (CORDERO *et al.*, 1999).

Em alguns países, como no Chile, a fasciolose hepática é a principal enfermidade parasitária dos animais de pastejo (FREDES, 2004).

A doença nos animais assume normalmente uma forma aguda ou uma forma crônica. A forma aguda é ocasionada quando os animais ingerem uma grande quantidade de metacercárias em um curto período de tempo. Os sintomas são decorrentes das lesões provocadas pela migração maciça das larvas através do intestino, pelo peritônio e no parênquima hepático (SOULSBY, 1987; URQUHART *et al.*, 2001). Com isto ocorrem diarréias, febre, anemia, podendo em alguns casos, como acontece em cordeiros ocasionar até uma alta mortalidade em 12 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas (CORDERO *et al.*, 1999). Nesta apresentação da doença não é possível o diagnóstico coproparasitológico, uma vez que não existem formas adultas do parasito no fígado. A forma crônica, por sua vez, ocorre quando os animais ingerem poucas metacercárias durante um longo período de tempo, podendo assim reagir e reacionarem à infecção. Os sintomas decorrentes da migração das larvas são mais brandos, predominado os sintomas causados pela disfunção hepática, tais como, emagrecimento, atraso no crescimento, diminuição da fertilidade, queda na produção de leite, carne e lã (GONZÁLEZ, 1982), ascite, icterícia. A diarréia normalmente está presente, e a anemia também, mas, normalmente é moderada.

As lesões ocasionadas pelo parasito são: destruição tecidual, hemorragia, inflamação e fibrose ocasionada pela migração das larvas pelos tecidos do hospedeiro. No fígado ocorre, no princípio, um aumento de volume devido à inflamação, e posteriormente uma redução do mesmo, devido à fibrose, ficando os ductos biliares

engrossados e salientes à superfície do órgão. A coloração do fígado, vermelho intensa no início, devido à hemorragia, torna-se amarelo-esbranquiçada. Ocorre um espessamento das paredes dos ductos biliares, proliferação e calcificação dos mesmos, observam-se formas adultas dos parasitos nos ductos. A fibrose é intensa, envolvendo o espaço porta e avançando pelo estroma, substituindo o parênquima do órgão por tecido conjuntivo. Nesta forma de apresentação a doença pode ser diagnosticada por exames coproparasitológicos. As perdas econômicas são grandes, em função do acima exposto. Como exemplo, no frigorífico onde foram coletados os espécimes para a presente pesquisa, 100% dos fígados de bubalinos é condenado pelo serviço de inspeção federal e destinado a graxaria, em virtude da alta prevalência da parasitose nos animais.

Devido às características já expostas: a) uma fase do ciclo do parasita desenvolve-se em um molusco anfíbio que tem a capacidade de hibernar por longos períodos quando as condições de temperatura e umidade lhe são adversas. Desta forma o ciclo do parasito fica em “suspenso” a baixas temperaturas, b) a alta resistência da metacercária e sua persistência por até um ano no meio ambiente, c) a grande multiplicação do parasito por pedogênese no interior do molusco podendo um único miracídio originar centenas de metacercárias, d) a doença poder ser introduzida em uma propriedade, tanto através de animais doentes, quanto de moluscos infectados, e) a ocorrência em várias espécies de mamíferos, inclusive silvestres; torna-se evidente que apenas com o uso de anti-helmínticos não é possível controlar a doença, e que a erradicação da mesma é algo impensável. Entretanto, em função deste conhecimento, e da sazonalidade das várias etapas do ciclo do parasito, podem ser adotadas medidas de manejo sanitário que permitam seu controle. Pode-se interpor vários “obstáculos” ao ciclo do parasito, reduzindo assim os danos provocados pelo mesmo. Entre eles pode-se mencionar: o diagnóstico e tratamento precoce da doença; a vermifugação estratégica dos animais reduzindo assim, a contaminação do ambiente, por exemplo,

antes de introduzi-los na propriedade e em épocas que antecedem aquelas onde ocorre a maior evolução do parasito e da infecção animal; a drenagem das águas estagnadas, dificultando a sobrevivência dos moluscos; a introdução de espécies predadoras dos moluscos; a colocação de cercas ao redor de áreas de banhado, evitando assim o acesso e a contaminação dos animais; a separação das áreas de pastejo dos animais jovens da dos animais adultos, evitando que os jovens pastem em locais muito contaminados (FREDES, 2004).

O homem era considerado até a pouco tempo um hospedeiro acidental do parasito, mas, dados de prevalência como os relatados a seguir e a participação do homem em certas situações como elemento propagador da parasitose, a tornaram hoje uma importante zoonose parasitária (FREDES, 2004).

Epidemiologicamente, a classificação mais atual das formas de ocorrência da doença no homem é a seguinte (FREDES, 2004):

- a. Casos importados: casos humanos diagnosticados em zonas livres de *F. hepatica* (inclusive ausente entre os animais), que foram infectados em uma zona de transmissão de fasciolose.
- b. Casos autóctones, isolados, não constantes: os pacientes adquirem a infecção na área em que habitam e onde também está presente a fasciolose animal. Estes casos aparecem esporadicamente, sem constância;
- c. Casos endêmicos: podem distinguir-se três tipos de situações segundo a prevalência na população total, obtida por diagnóstico coproparasitário:
 - a) Hipoendêmico: a prevalência é menor que 1%, a média aritmética da intensidade é menor que 50 ovos por grama de fezes (opg), pacientes com altos níveis de opg são casos

esporádicos; a participação humana na transmissão, através da eliminação de ovos é sem importância; em geral existem boas condições sanitárias no ambiente;

- b) Mesoendêmico: prevalência de 1 a 10%, pode apresentar uma alta prevalência em crianças de 5 a 15 anos; a intensidade em comunidades humanas pode ser de 50-300 opg, podem aparecer casos com altos níveis individuais de opg, ainda que as intensidades maiores que 1.000 opg sejam raras; as pessoas podem participar na transmissão através da eliminação de ovos;
 - c) Hiperendêmico: prevalência maior que 10%, pode existir uma alta prevalência em crianças dentre 5 e 15 anos; geralmente a intensidade é maior a 300 opg, podem aparecer casos com níveis individuais de opg muito altos, sendo muito freqüentes as intensidades maiores que 1.000 opg; os casos humanos participam significativamente na transmissão através da eliminação de ovos. Geralmente as condições sanitárias são precárias.
- 4) Epidêmicos: Há diferentes tipos de surtos de acordo com a situação endêmica/não endêmica da zona.
- a) Epidemia em áreas onde a fasciolose é endêmica nos animais, mas não em humanos: zonas onde os relatos prévios de casos humanos têm sido sempre isolados e esporádicos; estes surtos geralmente envolvem poucos indivíduos, que se infectam no mesmo foco de contaminação (família ou pequeno grupo, agrião ou hortaliças silvestres, de cultivo doméstico ou comercial, portadoras de metacercárias);

b) Epidemia em áreas humanas endêmicas: surtos em zonas onde a enfermidade é endêmica em humanos. Podem envolver um grande número de indivíduos; usualmente estão relacionados às condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do ciclo biológico tanto do parasito quanto do molusco. A epidemia pode ocorrer em áreas hipoendêmicas, mesoendêmicas ou hiperendêmicas (MAS-COMA *et al.*, 1999a).

Para ilustrar o que foi citado acima, verificou-se, em nível mundial, áreas de baixa prevalência da fasciolose humana como na Córsega com 0,83-1,16 casos/100.000 habitantes e Normandia (França) com 0,34-3,1 casos/100.000 habitantes; prevalência intermediária, como no delta do Nilo (Egito) com 7,3%, Cajamarca (Peru) com 8,7%; e, alta prevalência, como na região de Puno com 15,64% e no vale de Mantaro com 34,2% (ambos no Peru) e no altiplano boliviano, onde foram detectados até 66,7% mediante exames coproparasitológicos e mais de 53% usando técnicas imunoparasitológicas (MAS-COMA *et al.*, 1999a).

Esteban *et al.* citado por Mas-Coma *et al.* (1999a) no ano de 1998, descreveram que de um total de 7.071 casos humanos reportados em 51 países nos últimos 25 anos, 487 casos eram da África, 3.267 da América, 354 da Ásia, 2.951 da Europa e 12 da Oceania. Estimativas recentes sugerem que há entre 2,4 milhões e 17 milhões de pessoas infectadas por *F. hepatica* em todo o mundo (FREDES, 2004).

No homem esta zoonose se manifesta às vezes como surtos familiares de fasciolose associada à ingestão de verduras contaminadas com metacercárias (ATLAS, 1991; ESPINO *et al.*, 1997; RODRIGUEZ *et al.*, 1998).

A doença no homem pode apresentar alguns dos seguintes sinais e sintomas: febre, dor abdominal, inapetência, náusea e diarreia, urticária, asma brônquica, dispnéia, hemoptise, dor torácica, hepato e esplenomegalia, ascite, anemia leve a

moderada, icterícia, colangite e colecistite, obstrução do ducto biliar (MAS-COMA *et al.*, 1999b). O parasito pode apresentar localização errática, tendo já sido encontrado nos seguintes locais: tracto gastrointestinal, tecido subcutâneo, coração, vasos sanguíneos, pulmão, cavidade pleural, cérebro, parede abdominal, apêndice, pâncreas e baço. Tais parasitas nunca chegam a madurar (MAS-COMA *et al.*, 1999b). A duração da infecção humana é desconhecida, alguns investigadores estimaram que o parasito poderia sobreviver por 5 a 12 anos (KARNAUKHOVA, 1978, citado por MAS-COMA *et al.*, 1999b) e de 9 a 13,5 anos (DAN *et al.* (1981) citado por MAS-COMA *et al.*, 1999b).

O diagnóstico da parasitose pode ser feito por meios diretos e indiretos. Os meios diretos envolvem a detecção dos ovos do parasito mediante exames coproparasitológicos, destes, o mais comum é o de HOFFMANN, PONZ e JANER, (1934) que se baseia na suspensão das fezes com água e sedimentação dos ovos do parasito em cálice de sedimentação, com posterior avaliação do sedimento por microscopia. Tal exame tem uma sensibilidade 78% e, uma especificidade de 100% desde que a pessoa que vai fazer o reconhecimento dos ovos seja bem treinada. Para os ruminantes, a técnica mais adequada é a dos quatro tamizes de GIRÃO & UENO (1985). Esta se baseia na passagem de uma suspensão aquosa de fezes através de quatro tamizes metálicos com malhas progressivamente mais estreitas, concentrando assim os ovos do parasito que ficam retidos no último tamiz, e retirando as fibras e outras partículas que ficam retidas nos tamizes anteriores. O tamiz é então lavado sobre uma placa de Petri, dividida em quadrantes e levado à avaliação em microscópio estereoscópico, onde os ovos são identificados e contados. A sensibilidade deste exame é maior que a do anterior, podendo chegar a 90% ou mais, com relação à especificidade aplica-se o que já foi dito anteriormente. O problema deste tipo de exames, é que os mesmos só permitem a detecção no período patente da doença, que ocorre entre dois meses e meio a três meses depois da penetração do agente etiológico

no organismo (DUMÉNIGO *et al.*, 1999), não detectando a infecção em sua forma aguda e podendo permitir a contaminação prévia das pastagens.

Dentre os métodos indiretos de diagnóstico, a sorologia tem sido a ferramenta de eleição, pela qual são pesquisados no soro dos animais doentes, anticorpos contra o parasito. Seu valor diagnóstico tem sido limitado pela presença de reatividade cruzada com outros parasitos. Na atualidade, a prova de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é uma das ferramentas diagnósticas mais empregadas, e, aplicável em grande escala, cuja sensibilidade e especificidade depende da fonte do antígeno utilizado. Por pesquisar anticorpos, pode ocorrer que indivíduos já curados continuem reagentes ao teste, dando uma falsa positividade ao mesmo. Entretanto, o uso desta técnica permite um diagnóstico precoce da parasitose, ao detectar estados jovens do parasito, permitindo o tratamento em uma fase mais oportuna (FREDES, 2004).

Mais recentemente, alguns grupos de pesquisadores têm desenvolvido e aplicado, a prova de ELISA para a pesquisa de coproantígenos da *Fasciola hepatica* em ovinos, bovinos e no homem. As vantagens são que ela só é positiva quando a doença está presente e permite uma coleta mais fácil de material, se comparada à coleta de sangue, principalmente se considerarmos animais de difícil contenção ou captura, como é o caso dos bubalinos ou de animais silvestres e, no homem, casos em que a crença religiosa e/ou o medo façam com que o doente se oponha à coleta de sangue. No caso de animais silvestres, esta técnica torna possível monitorar a enfermidade coletando-se fezes frescas dos mesmos, sem haver a necessidade do contato humano com os referidos animais.

A seguir é feito um relato dos principais trabalhos que padronizaram técnicas de imunodiagnóstico para *Fasciola hepatica* apresentados por ordem cronológica:

OLDHAM (1983) através de cromatografia em Sephadex 500, obteve, a partir de extrato solúvel de *Fasciola hepatica* adulta em PBS, sete frações, separadas por

peso molecular, (F1-F7) que foram testadas antígenicamente mediante a técnica de ELISA frente a soros de bovinos infectados experimentalmente. A antigenicidade das frações variou, sendo que a proteína denominada F1 foi a mais antigênica. Anticorpos para F1, F2 e F3 surgiram no começo da infecção e, em sua maior parte, persistiram até 14 semanas estudadas, enquanto que anticorpos para F4 e F5 aumentaram gradualmente durante as 14 semanas pós-infecção. Um ensaio foi padronizado para medir anticorpos contra-F1. O ensaio foi reprodutível, e capaz de detectar anticorpos por três semanas pós-infecção em bovinos infectados experimentalmente.

ESPINO *et al.* (1987) pesquisaram em soro sanguíneo humano, de 20 pacientes com infecção patente por *Fasciola hepatica*, a presença de anticorpos contra o parasito, por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) utilizando produtos de secreção/excreção (ES) do parasito adulto cultivados 24h *in vitro*. A especificidade do ES-ELISA (com valores de absorbância >0,38) permitiu a diferenciação entre fasciolose, esquistossomose, amebíase, clonorchiose, trichuríase, filariose e ancilostomose.

HILLYER e SOLER (1988), aplicando imunoeletrotransferência (EITB) sobre antígeno E-S do parasito, descrevem dois polipetídeos antigênicos, um de 17 kDa e outro de 63 kDa. Entretanto, este último apresentou reatividade cruzada com outras parasitoses, sugerindo que o antígeno de 17 kDa era um excelente candidato para o diagnóstico da fasciolose aguda e crônica, e que poderia ser específico para esta. Após aplicar um FAST ELISA com o mesmo tipo de antígeno, sugerem que existe um número limitado de epítomos causadores de reatividade cruzada no antígeno E-S.

TELLO *et al.* (1988), buscando melhorar o diagnóstico sorológico da fasciolose, avaliaram a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), comparando-a com o método de fixação do complemento (FC). Demonstraram que ambas as provas tinham 77,14% de correlação e a consideraram como ferramenta útil no

imunodiagnóstico da fasciolose. A sensibilidade da RIFI foi levemente maior que a FC e que seria uma boa alternativa frente a resultados de anticomplementariedade.

MERCADO (1989), no Chile, aplicando SDS-PAGE e posterior EITB a um extrato bruto de *F. hepatica*, distinguiu ao menos 18 bandas com peso molecular (PM) entre 96 e 14 kDa, demonstrando a diversidade e a complexidade da resposta de anticorpos específicos induzidos pela presença de *F. hepatica*. Soros de 12 sobre 14 pacientes (86%) com fasciolose comprovada, reconheceram um grupo de peptídeos cujo peso molecular estaria entre 94 e 66 kDa. Pela sua elevada sensibilidade o autor os considera potenciais candidatos para serem empregados em provas sorológicas de rotina.

YAMASAKI *et al.* (1989) realizaram, no Japão, o primeiro estudo que identificou e caracterizou uma enzima, a cisteína-proteinase de 27 kDa purificada a partir de exemplares adultos do parasito. Esta proteína foi usada como antígeno em uma prova de ELISA, demonstrando ser reconhecida por 100% dos pacientes com fasciolose. Esta protease estaria envolvida na alimentação, migração e evasão da resposta imune do parasito (SMOOKER, 2000).

ESPINO *et al.* (1990), desenvolveram um teste de ELISA para detectar antígeno parasitário circulante em pacientes com fasciolose. O teste aplicado em 25 pacientes apresentou 100% de positividade, além do que, não foram observadas reações cruzadas com outras parasitoses.

KHALIL *et al.* (1990) realizaram um trabalho no Egito, visando determinar o efeito da purificação de antígenos brutos de *F. gigantica* e *F. hepatica* sobre as reações cruzadas encontradas em contraímuno eletroforese (CIEP), hemoaglutinação indireta (IHA) e ELISA, com soros de pacientes portadores de enfermidades parasitárias e não parasitárias. Assim, determinaram que usando CIEP o antígeno semipurificado de *F. hepatica* é mais específico que o antígeno bruto, o mesmo tendo sucedido com a

aplicação de ELISA, onde obtiveram melhores resultados com o antígeno semi purificado. Ao aplicar IHA o antígeno purificado apresentou menor especificidade que o antígeno bruto.

GORMAN *et al.* (1991) citam que a resposta obtida mediante aplicação de um teste ELISA para detectar a resposta imune em espécies de cordeiros de pastejo no Chile apresentou 60% de sensibilidade e 70% de especificidade. Descrevem os autores também que existiria uma associação entre o número de animais positivos e a carga parasitária.

HILLYER *et al.* (1992) utilizaram FAST-ELISA e EITB com antígeno E-S de *Fasciola hepatica* com objetivo de determinar a prevalência da infecção no Altiplano boliviano. De vinte indivíduos que apresentaram exames coproparasitológicos positivos, 19 apresentaram exames sorológicos pelo FAST-ELISA, o que determina uma sensibilidade de 95% enquanto que no caso do EITB os 20 soros reconheceram uma proteína de aproximadamente 12 kDa (100% de sensibilidade). Entretanto, outras proteínas como as de 63 e 17 kDa só foram reconhecidas pelos indivíduos que apresentavam altos valores de absorbância no FAST-ELISA.

HILLYER *et al.* (1992) em Porto Rico, isolaram de *Fasciola hepatica* a fração Fh15 que apresentava proteção contra *F. hepatica* e *S. mansoni*.

JEMLI *et al.* (1992) utilizando uma prova ELISA, pode detectar a resposta imune de cordeiros contra *F. hepatica* a partir da segunda semana de infecção.

ZULANTAY *et al.* (1992) utilizando um IgG ELISA e um antígeno somático solúvel de *F. hepática*, obtiveram uma sensibilidade de 92,3% e uma especificidade de 99,4%. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 91,6% e 99,4% respectivamente.

SILVA *et al.* (1993), no Chile, em um estudo de âmbito nacional, utilizando EITB e antígeno E-S do parasito, obtiveram alta especificidade e sensibilidade de vários

grupos de bandas polipeptídicas de PM aproximados de 96-109; 75-84; 49-50, 38-40; 30-33 e 16-26 kDa.

ESPINO e FINLAY (1994) usaram teste ELISA para a detecção de antígenos de excreção/secreção (ES) circulantes em humanos (14 pessoas) com evidência coproparasitológica de fasciolose hepática, das quais 13 reagiram positivamente ao teste, com níveis de antígeno circulante superiores a 15 ng/ml (limite de detecção do teste). Retestados 2 meses após o tratamento, mediante exame coproparasitológico e ELISA, 11 que negativaram no teste coproparasitológico também o fizeram no ELISA, e três que continuaram apresentando ovos de *Fasciola hepatica* nas fezes, continuaram a reagir positivamente no teste ELISA. O imunodiagnóstico foi realizado com um anticorpo monoclonal (ES78, imunoglobulina de rato G2a) para a captura dos antígenos de ES de *Fasciola hepatica* e um conjugado anticorpo policlonal de coelho peroxidase para a identificação dos antígenos ES.

SHAKER *et al.* (1994a) a partir de um antígeno bruto de *F. hepatica*, realizaram SDS-PAGE e EITB, evidenciando sete bandas com peso molecular entre 54 e 12 kDa, sendo especificamente reconhecidas pelos soros positivos à fasciolose, as bandas de 54 e 33 kDa.

SHAKER *et al.* (1994b), utilizaram ELISA e EITB para detectar anticorpos circulantes contra *F. hepatica* em soro de pacientes infectados, contra um antígeno purificado por imunoafinidade, obtido do parasito adulto. O teste ELISA apresentou 100% de sensibilidade e 93% de especificidade, enquanto que com EITB obteve-se 100% de especificidade e sensibilidade. Então os autores afirmam que este ELISA pode ser utilizado como uma boa prova de *screening*, enquanto que EITB serviria como um teste confirmatório no imunodiagnóstico de fasciolose.

CASTRO *et al.*, (1994) em Cuba, aplicando um teste sandwich-ELISA (Fascidig) de anticorpo monoclonal, para a pesquisa de coproantígeno de *Fasciola*

hepatica em bovinos em três rebanhos obtiveram uma sensibilidade de 95,3%, especificidade de 99% e valores preditivos de 98% e 97% para positivos e negativos, respectivamente. Quando o mesmo teste foi aplicado em rebanhos de alta prevalência de fasciolose (40%), média prevalência (10%) e baixa prevalência (5%), constataram que o teste foi capaz de detectar 100%, 81,2% e 60% respectivamente. Demonstram que, pelos resultados obtidos, existe uma correlação entre a excreção de ovos por *F. hepatica* e a concentração de antígenos em fezes detectados pelo método de sandwich-ELISA.

RODRÍGUEZ-PÉRES e HILLYER (1995) usaram a técnica de micro-ELISA com duplo anticorpo para determinar a detecção de antígenos circulantes de secreção/excreção de *F. hepatica* denominados pelos autores de FhSE, e um FAST-ELISA para a medição da produção de anticorpos anti-FhSE em ovinos infectados com *Fasciola hepatica* e com *Schistosoma mansoni* e *Fasciola hepatica*. Constataram os autores, que a infecção prévia com *S. mansoni*, não interferiu na detecção de antígenos de secreção/excreção contra *Fasciola hepatica* circulantes nos animais que foi positiva para todos os animais. Quanto aos anticorpos circulantes anti FhSE, nos animais infectados com *F. hepatica*, foram detectados a partir da segunda semana pós-infecção e, nos animais infectados com *S. mansoni*, anticorpos de reação cruzada contra FhSE, foram detectados a partir de 4-6 semanas pós- infecção.

MARTINEZ *et al.* (1996) utilizando antígenos de secreção/excreção de *Fasciola hepatica*, por técnica de ELISA, verificaram a detecção de anticorpos no soro de dois grupos de cabras experimentalmente infectadas. O grupo número um foi infectado com 200 metacercárias, e, grupo número dois com 100 metacercárias do parasito e um grupo controle, não infectado. Para o teste foi usado o antígeno ES (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), soro das cabras infectadas diluído (1:800) e conjugado anti-IgG de cabra (1:1000). Níveis positivos de anticorpos (significativamente diferentes do grupo controle)

foram observados ao longo de 365 dias pós-infecção. Em todas as cabras infectadas, detectaram ovos nas fezes entre 60 a 90 dias pós-infecção. Após o experimento foram recuperados, por necropsia, uma média de 25,2 parasitos nos fígados dos animais do grupo 1 e 10,4 parasitos nos fígados dos animais do grupo 2.

SAMPAIO-SILVA *et al.* (1996), empregando EITB, em Portugal, demonstram que soro de pacientes portadores de fasciolose reconheceram especificamente polipeptídeos de 27, 25, 19, 16 e 12 kDa em 20. De todas só as proteínas de 27 kDa e 25 kDa foram reconhecidas pela totalidade dos soros, o que demonstrou seu potencial imunodiagnóstico. Além do que foi realizada ELISA utilizando como antígeno o extrato E-S do parasito, o que resultou numa sensibilidade de 95% e uma especificidade de 97%.

CÓRDOVA *et al.* (1997), mediante imunoeletroforese, identificaram dois antígenos de *F. hepatica*, um com 26 kDa (Fas 1) e outra com 25 kDa (Fas 2), os quais apresentavam atividade de cisteinil proteinase com diferente especificidade proteolítica. Os mesmos autores, em 1999, elaboraram um IgG/ELISA usando como antígeno ambas as cisteinil proteinases, que foram obtidas a partir de produtos de secreção/excreção do parasito. Ambas foram avaliadas em soro de 38 pacientes positivos a fasciolose obtendo resultados de sensibilidade e especificidade para Fas 1 de 89% e 98% e para Fas 2 de 95% e 100%. Enquanto que os valores preditivos positivo e negativo para ambas foram de 95% e 96% no caso de Fas 1 e de 100% e 98% para Fas 2. Com isto demonstraram que IgG ELISA com Fas 2 é altamente sensível e específico para o imunodiagnóstico da fasciolose humana.

HAMMAMI *et al.* (1997) em Túnez, aplicaram um ensaio de EITB com a finalidade de identificar antígenos específicos de *F. hepatica*, sobre um total de 28 soros provenientes de pacientes positivos a fasciolose. Foram reconhecidas 11 diferentes proteínas antigênicas, sendo que as de 57 e 29 kDa foram mais sensíveis e específicas,

com 100% de especificidade e sensibilidade de 73% e 93% respectivamente. Além do que, a proteína de 9-12 kDa só foi reconhecida em 47% dos casos.

ESPINO *et al.* (1997) descreveram a padronização de um ultramicro-ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-antígenos de secreção-excreção de *Fasciola hepatica* (UME-*Fasciola*) em soro sanguíneo. Foram estudados 56 pacientes com fasciolose, 168 com outras enfermidades (21 com *Trichuris trichiura*, 25 com *Ascaris lumbricoides*, 11 com *Giardia lamblia*, 9 com *Necator americanus*, 42 com *Plasmodium falciparum*, 10 com *Toxocara canis*, 14 com *Schistosoma mansoni*, 3 com *Opistorchis felineus* e 22 com *Entamoeba histolytica*) e 300 pessoas consideradas sadias. O teste padrão ouro foi o achado de ovos nas fezes ou fluido duodenal por exame parasitológico. O UME-*Fasciola* mostrou uma sensibilidade de 100%, especificidade de 98% e valores preditivos para positivos e negativos de 90,3 e 100%. Comparando as técnicas de UME-*Fasciola* com o ELISA convencional, houve uma concordância de 95,5%.

PELAYO *et al.* (1998), sobre um total de 24 pacientes, detectaram a presença de antígenos e complexos imunes circulantes (CIC) em 100% dos casos com fasciolose aguda (n=5), a presença de coproantígenos se fez evidente em 100% dos casos crônicos (n=19).

DÍAZ *et al.* (1998) identificaram, mediante a técnica de Western Blot, 31 componentes presentes nos antígenos de secreção-excreção de *Fasciola hepatica* adulta, reconhecidos por soros de ratos infectados experimentalmente. Os pesos moleculares das proteínas, variaram de 11 a 136 kD, onde as frações predominantes foram: 11-13 kD, 14-16kD, 23-33 kD, 55-57 kD, 65-71 kD e 86-136 kD. Determinaram também a cinética de produção de anticorpos por ELISA indireto. Detectaram anticorpos somente a partir da 2^a semana de infecção, em 80% dos animais e, na terceira semana em 100% deles.

DUMÉNIGO e VILLALVILLA (1998), trabalhando com exames coproparasitológicos em ovinos, pesquisaram 40 animais infectados por *Fasciola hepatica*, 88 animais com outras infecções parasitárias provadas por coprologia: *Haemonchus contortus*, (33); *Trichostrongylus*, (20); *Eimeria* sp., (18); *Trichuris ovis*, (14) e *Dicrocoelium dendriticum*, (3). O número de ovos por grama de fezes variou de 1 a 198, determinado pela técnica de Dennys et al., 1954 e 100 animais negativos coprologicamente. Realizaram ensaio imunoenzimático (*sandwich*) com o uso do anticorpo monoclonal ES78 previamente reportado para o diagnóstico de fasciolose bovina. Foram detectados antígenos de secreção-excreção em 38 dos 40 animais com fasciolose e não foi observado nenhum animal reativo para aqueles considerados negativos ou com outras parasitoses.

O'NEIL *et al.* (1998, 1999), determinaram que Catepsina L1 (CL1), uma cisteinil proteinase secretada por estágios adultos e juvenis de *F. hepatica* tem um potencial como agente diagnóstico da fasciolose humana. Para isto realizaram o teste ELISA dentro de uma população de 95 pacientes no Altiplano Boliviano. Usaram três tipos de antígenos: cru, E-S e CL1. Quando no teste foi usado antígeno bruto foi difícil diferenciar entre indivíduos soronegativos e soropositivos. Porém, com o antígeno E-S e CL1 houve uma grande discriminação entre os grupos. A reação foi melhorada usando o anticorpo IgG₄ (isotipo predominante na infecção). Quando os antígenos CL1 e E-S foram comparados, o primeiro identificou menos indivíduos soropositivos. Porém, permitiu discriminar melhor os sororeagentes dos não reagentes. A especificidade da prova foi alta, demonstrando que o IgG₄ ELISA é específico no diagnóstico da fasciolose.

TENDLER *et al.* (1998) patentearam uma proteína recombinante de 14 kDa (Sm 14) obtida a partir do *Schistosoma mansoni* que, inoculada em camundongos, conferiu 100% de proteção contra a infecção por *Fasciola hepatica*.

ABDEL RAHMAN *et al.* (1999) purificaram e caracterizaram bioquimicamente coproantígenos de 26 e 28 kDa de *Fasciola hepatica*. Estes mostraram-se relativamente estáveis sob condições de conservação. Por imunofluorescência indireta de cortes histológicos de trematodas adultos determinaram que a localização do antígeno, era em células intestinais e no tegumento.

MAHER *et al.* (1999), utilizando 60 soros de pacientes positivos (mediante exame coproparasitológico), mediram a resposta isotípica de anticorpos contra antígeno bruto de exemplares adultos de *F. hepatica*. Os isotipos IgG1 e IgG4 foram encontrados em 97/100% dos casos. Os anticorpos IgM, IgA, IgG2 e IgG3 foram menos dominantes. No caso de IgG1 foi encontrado também em soros de pacientes infectados com outras parasitoses como *Schistosoma*, *E. granulosus* e outros. Todavia, IgG4 foi detectado exclusivamente em soros de pacientes com fasciolose. Isto levou os autores a concluir que IgG4 ELISA com antígeno bruto de *F. hepatica* pode ser usado para um correto e sensível imunodiagnóstico de fasciolose humana.

ESPINO *et al.* (2000), demonstraram, aplicando EITB com soro hiperimune obtido frente a antígenos de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* às fezes de pacientes humanos com fasciolose hepática, a presença de coproantígenos com pesos moleculares: 14, 19, 20, 23, 25, 32, 46, 51 e 62 kDa. Constataram os autores, que as proteínas de 14, 20, 23 e 51 kDa eram reconhecidas também pelo soro da maioria de pacientes crônicos. Os autores detectaram em fezes de ratos infectados experimentalmente coproantígenos de pesos moleculares: 11, 14, 17, 24, 26, 32, 47, 51 e 66 kDa.

MORALES *et al.* (2000), citam que no Chile, a prevalência da *Fasciola hepatica* na região VII é de 87,4 % em bovinos e que a prevalência de 1989 a 1995 em animais deste país, encaminhados a matadouros com inspeção oficial foi de 30,1% em bovinos, 2,1 % em ovinos, 1,2% em suínos, 12,3% em eqüinos e 14% em caprinos.

CARNEVALE *et al.* (2001), utilizando antígenos de secreção-excreção de *Fasciola hepatica* nas técnicas de ELISA e micro-ELISA, para pesquisa de IgG anti-*F. hepatica* em soro sanguíneo, obtiveram uma sensibilidade de 100% para ambas as técnicas e uma especificidade de 100% para a ELISA e 97% para a micro-ELISA. Foi testada a possibilidade de reação cruzada em pacientes com *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, *Plasmodium vivax*, cisticercose, hidatidose, trichinose, toxocaríase, *Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Enterobius vermicularis*, *Strogylodes stercoralis*, *Trichuris trichiura*, *Taenia spp.*, *Entamoeba histolítica*, *Giardia lamblia*, sífilis, tuberculose, hepatite A, hepatite B e hepatite C, e não foi encontrada reação cruzada para os referidos agentes e patologias.

CORNELISSEN *et al.* (2001), a partir da proteína CL1, confeccionaram peptídeos sintéticos, aos quais foi avaliado o potencial diagnóstico mediante ELISA usando soros de bovinos infectados naturalmente. Os valores de sensibilidade e especificidade foram de 98,9% e 99,8% respectivamente.

FREDES *et al.* (2001) purificaram dois polipeptídeos (14 kDa e 29 kDa) de *Fasciola hepatica* adulta por electroeluição e avaliaram sua aplicação diagnóstica através de *Western Blotting*. Obtiveram 95% e 97,5% respectivamente de sensibilidade e especificidade de 100% para ambos os peptídeos. O polipeptídeo de 29 kDa foi reconhecido por soro de ovinos infectados a partir da 6^a semana pós infecção e o de 14 kDa a partir da 8^a semana.

ESCALANTE *et al.* (2001), utilizando uma técnica de imunocromatografia, detectaram antígenos de secreção/excreção de *Taenia solium* tanto em meio onde foi incubado o parasito quanto em fezes de *Mesocricetus auratus* parasitados. Sugerem o aperfeiçoamento da técnica para a aplicação diagnóstica em humanos.

CORNEJO *et al.* (2003) determinaram a prevalência de fasciolose humana em uma área endêmica, mediante um imunoenensaio enzimático que emprega a cistatina

como agente de captura, para a detecção de anticorpos específicos para cisteinil proteinases de *Fasciola hepatica*. O referido teste detectou anticorpos específicos para tais proteinases sem ter que purificá-las. A prevalência na área em questão, província de Chupaca-Junin no Peru, foi de 13,5%.

ZUBIETTA (2003), em sua revisão da aplicação de técnicas imunológicas em parasitologia, cita como vantagens destas em relações aos métodos copro-parasitológicos, a maior sensibilidade, maior especificidade, a possibilidade de trabalhar com populações e de serem de rápida execução. Relata a utilização da pesquisa de coproantígenos em amostras fecais e de anticorpos séricos pela técnica de ELISA para o diagnóstico das parasitoses em animais e em humanos, a maior sensibilidade e especificidade que outros métodos diagnósticos empregados, e a possibilidade de quantificação que permite diagnosticar grande quantidade de indivíduos em curto prazo. Demonstra que pode ser importante ferramenta epidemiológica para a determinação da prevalência de anticorpos em populações animais, com possibilidade de detectar parasitoses dentro do período pré-patente, para o monitoramento em campanhas de controle de enfermidades zoonóticas e na produção animal.

MINOZZO (2003), realizando teste ELISA medindo a reatividade de diferentes antígenos frente a soro de coelho hiperimune anti-antígeno total de *F. hepatica*, obteve os seguintes valores de absorbância, efetuando a leitura da placa em comprimento de onda de 492 nm: *F. hepatica* 1,134; *C. cellulosae* 0,102; *C. longicollis* 0,051; *C. tenuicollis* 0,019; *T. saginata* 0,147; *H. nana* 0,114; *D. caninum* 0,163; Hidatide 0,024; *C. bovis* 0,036; *A. suum* 0,018, o que demonstra que o anticorpo policlonal não apresentou reatividade cruzada entre os referidos parasitas.

FREDES (2004) fez uma revisão sobre a fasciolose hepática, e diagnóstico nos animais e no homem, com ênfase no estudo de frações antigênicas de interesse imunodiagnóstico. O autor cita que no Chile a fasciolose é a principal enfermidade

parasitária que afeta as espécies de pastejo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos deste estudo foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- a) Seleção das populações de animais a serem estudados;
- b) Obtenção de antígenos de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* e antígenos totais de *Fasciola hepatica*, *Euritrema coelomaticum* e de *Ascaris suum*;
- c) Obtenção do anticorpo policlonal anti-antígeno de secreção/excreção de *F. hepatica*;
- d) Enzimoimunoensaio (ELISA);
 - Padronização do teste imunoenzimático;
 - Cinética de produção de anticorpos em coelhos imunizados com antígeno de secreção de excreção e antígeno total de *Fasciola hepatica*;
 - Determinação da quantidade mínima de antígeno FhSE detectada pelo soro hiperimune de coelho anti- FhSE;
 - Padronização do teste ELISA para a pesquisa de coproantígenos de *Fasciola hepatica* em bubalinos;
 - Aplicação do teste ELISA para a pesquisa de coproantígenos de *F. hepatica* nas populações de animais escolhidas.
- e) Imunoeletrotransferência (EITB) - Aplicação de técnica de imunoeletrotransferência para a pesquisa de proteínas antigênicas nos produtos de secreção/excreção de *Fasciola hepatica*, nos extratos brutos de *F. hepatica* e *Euritrema coelomaticum* e nas fezes de bubalinos com *F. hepatica* e bovinos com *E. coelomaticum*;

- f) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) - Aplicação de técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para verificar o perfil cromatográfico dos produtos de secreção/excreção de *F. hepatica*, dos extratos brutos de *F. hepatica*, *Euritrema coelomaticum* e *Ascaris suum* e, das fezes de bubalinos com *Fasciola hepatica* e bovinos com *Euritrema coelomaticum*, com a finalidade de verificar a possibilidade da utilização da técnica com fins diagnósticos.

4.1 SELEÇÃO DAS POPULAÇÕES

Foram utilizadas quatro populações de bubalinos (*Bubalus bubalis* Linnaeus 1758):

- a) População 1 – constituída de 10 animais negativos para *Fasciola hepatica* procedentes de zona indene (São João do Triunfo) e 10 positivos procedentes de zona endêmica (Guaratuba), utilizada para padronizar o teste ELISA. A positividade ou negatividade foi constatada mediante exame in loco dos fígados em frigorífico;
- b) População 2 - dez animais negativos para *Fasciola hepatica* para estabelecer o nível de corte da reação entre animais reagentes dos não reagentes (cut off do teste);
- c) População 3 - compreendendo 40 animais, sendo vinte deles intensamente parasitados por *Fasciola hepatica* procedentes de um rebanho de alta prevalência da doença e vinte não portadores de *Fasciola hepatica* procedentes de outro rebanho, oriundo de zona indene;
- d) População 4 - compreendendo 220 animais, provenientes de vários rebanhos com diversos índices de prevalência da parasitose, sendo 100 animais portadores de *Fasciola hepatica* em intensidade variada e 120 não

portadores de *Fasciola hepatica*;

- e) População 5 – 10 bovinos positivos para euritrematose, mas não portadores de fasciolose, procedentes da região metropolitana de Curitiba, para a pesquisa de coproantígenos de *Euritrema coelomaticum*, mediante a imunoeletrotransferência.

Obs: O critério para a inclusão na população era a presença ou ausência dos parasitos na inspeção “pos morte” (inspeção federal).

As fezes dos bubalinos foram coletadas no Frigorífico Argus, em São José dos Pinhais, Região Metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil, abatidos no período de 27 de março a 04 de julho de 2004. Os animais eram procedentes da região litorânea do Paraná, Vale do Ribeira, Cerro Azul, Adrianópolis e São João do Triunfo.

É de ocorrência comum na região, os bubalinos estarem parasitados por *Neoscaris vitulorum* e *Euritrema coelomaticum*.

4.2 OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE *Fasciola hepatica* (FhSE) E ANTÍGENOS TOTAIS DE *Fasciola hepatica* E *Euritrema coelomaticum*

4.2.1 Produção do Antígeno de Secreção/Excreção de *Fasciola hepatica* (FhSE)

O antígeno FhSE foi produzido conforme metodologia descrita por RODRIGUEZ-PEREZ e HILLYER (1995) (detalhada no Apêndice A), adaptada para o presente estudo. Os parasitos foram obtidos dos ductos biliares de fígados de bubalinos parasitados, abatidos no Frigorífico Argus em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil.

Quarenta exemplares adultos de *Fasciola hepatica* foram incubados em 150 ml de PBS pH 7,2 contendo EDTA 0,01 M e penicilina 40 UI/mL, a 37°C durante 3 h.

O meio, após a incubação, foi concentrado em polietilenoglicol, utilizando-se tubo de membrana de celulose para diálise (Sigma D-9777), com retenção de 12.000 Da. O processo foi realizado sob refrigeração. Após a diálise, foram adicionados ao extrato concentrado 19 µl de PMSF 0,2 M e o referido extrato foi centrifugado a 10.000g por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então separado em alíquotas de 1,5 mL e armazenado a -20°C até o uso. A concentração de antígeno obtida foi de 700 µg/mL.

4.2.2 Produção do Antígeno Total de *Euritrema coelomaticum*

O antígeno foi produzido conforme metodologia descrita por MINOZZO (2003) para *Cysticercus celulosae* (Apêndice B). Os trematódeos foram obtidos de pâncreas de bovinos parasitados, abatidos no Frigorífico Argus.

4.2.3 Obtenção de Antígenos Totais de *Fasciola hepatica* (concentração: 1.400 µg/mL) e *Ascaris suum* e de Soro Hiperimune Contra o Antígeno Total de *Fasciola hepatica*

Os antígenos foram produzidos conforme metodologia descrita por MINOZZO (2003) para *Cysticercus celulosae*.

4.3 OBTENÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI-ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE *Fasciola hepatica*

Os soros hiperimunes foram obtidos em coelhos *Oryctolagus cuniculus* da raça Nova Zelândia, albinos. Foram inoculados dois coelhos com cada antígeno. Os animais pesavam 2,7 e 2,9 Kg e ao chegarem ao biotério foram submetidos a exames coproparasitológicos para confirmar a ausência de helmintos e outros parasitas. Após um período de adaptação de 10 dias foram imunizados com o antígeno FhSE. Cada animal recebeu no ciclo de imunização 3,45 mg de proteína de antígeno, divididos em 3

doses de 1,15 mg. Os animais foram inoculados com o antígeno na região dorsal, por via subcutânea, em quatro pontos distintos. A primeira dose foi uma emulsão de 3ml, constituída de volumes iguais de solução antigênica e adjuvante de Freund completo. Após 30 dias foi inoculada a segunda dose, sendo volumes iguais de solução antigênica e adjuvante de Freund incompleto. Aos 45 dias do início da imunização os animais receberam a terceira dose idêntica à segunda. Sangrias de prova foram realizadas na veia marginal da orelha dos animais num volume aproximado de 10 ml, nos dias 0, 15, 30, 45 e 60. Sangria de produção foi realizada por punção cardíaca, num volume de 50 ml, realizada no 67º. dia após a inoculação inicial do antígeno. Os soros obtidos, após titulados, foram armazenados a -20°C até o seu uso. A titulação de anticorpos foi realizada segundo técnica de ELISA descrita a seguir.

4.4 ENZIMOIMUNOENSAIO - *ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA): PRINCÍPIO E FLUXOGRAMA DA REALIZAÇÃO PRÁTICA

O ensaio imunoenzimático (ELISA), baseia-se no uso de antígenos ou anticorpos marcados com uma enzima, de forma que os conjugados resultantes tenham atividade tanto imunológica quanto enzimática. Apresenta um dos componentes (antígeno ou anticorpo) fixado sobre um suporte adsorvente, o complexo antígeno-anticorpo-conjugado fica imobilizado, e a reação pode ser facilmente revelada mediante a adição de um substrato específico que poderá atuar com a enzima produzindo uma cor visível a olho nu ou quantificável mediante o uso de técnicas colorimétricas e espectrofotométricas. No campo da Parasitologia estas técnicas adquiriram relevância nos últimos anos para o diagnóstico mediante a detecção de coproantígenos em amostras fecais e anticorpos séricos, tanto em medicina humana como veterinária (ZUBIETA, 2003).

Para a realização prática do teste foram executadas as seguintes etapas

(Figura 1):

- a) Sensibilização das placas com 200 µl, por cavidade, de solução de antígeno diluído em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6 (coating buffer);
- b) Incubação da placa durante 14 horas à temperatura de 4 a 8 °C.;
- c) Lavagem da placa, duas vezes, com solução de lavagem (NaCl 0,85%, tween 20 0,05%);
- d) Bloqueio da reação com a adição de 200 µl, por cavidade, de solução de bloqueio (caseína 2% em PBS com 0,05% de tween 20);
- e) Incubação da placa por uma hora a 37 °C;
- f) Lavagem da placa, duas vezes, com solução de lavagem para ELISA;
- g) Diluição do soro em tampão de incubação (0,25% de caseína, 0,05% de tween 20, em PBS), adição de 200 µl por cavidade;
- h) Incubação da placa por uma hora a 37 °C;
- i) Lavagem da placa, seis vezes, com solução de lavagem para ELISA;
- j) Adição de 200 µl, por cavidade, do conjugado anti-IgG de coelho peroxidase (sigma A-6154) diluído em tampão de incubação;
- k) Incubação por uma hora a 37 °C;
- l) Lavagem da placa, seis vezes, com solução de lavagem para ELISA;
- m) Adição de 200 µl, por cavidade, de substrato/cromógeno contendo H₂ O₂ e OPD (Ortofenilelodiamino);
- n) Incubação durante 15 minutos a 24 °C;
- o) Interrupção da reação com 50 µl de H₂SO₄;
- p) Leitura da absorbância, empregando comprimento de onda de 492 nm.

4.4.1 Padronização da Técnica de ELISA e Verificação da Resposta Imune no Soro Policlonal de Coelhos Imunizados com Antígeno de Secreção e Excreção de *Fasciola hepatica*

Para avaliar a resposta imune dos coelhos frente ao antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* - FhSE trabalhou-se com diferentes concentrações de antígeno por cavidade: 125, 250, 500 e 1.000 nanogramas (ng).

O conjugado usado foi anti-IgG de coelho peroxidase, analisado nas diluições de 2.500, 3.750 e 5.656 vezes.

Como anticorpo reagente utilizou-se soro de coelho imunizado com o antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* FhSE, diluído em 400, 800 e 1.600 vezes.

Como cromógeno utilizou-se 40 µg de OPD por cavidade. O substrato foi peróxido de hidrogênio a 30% na diluição de 2.750 vezes.

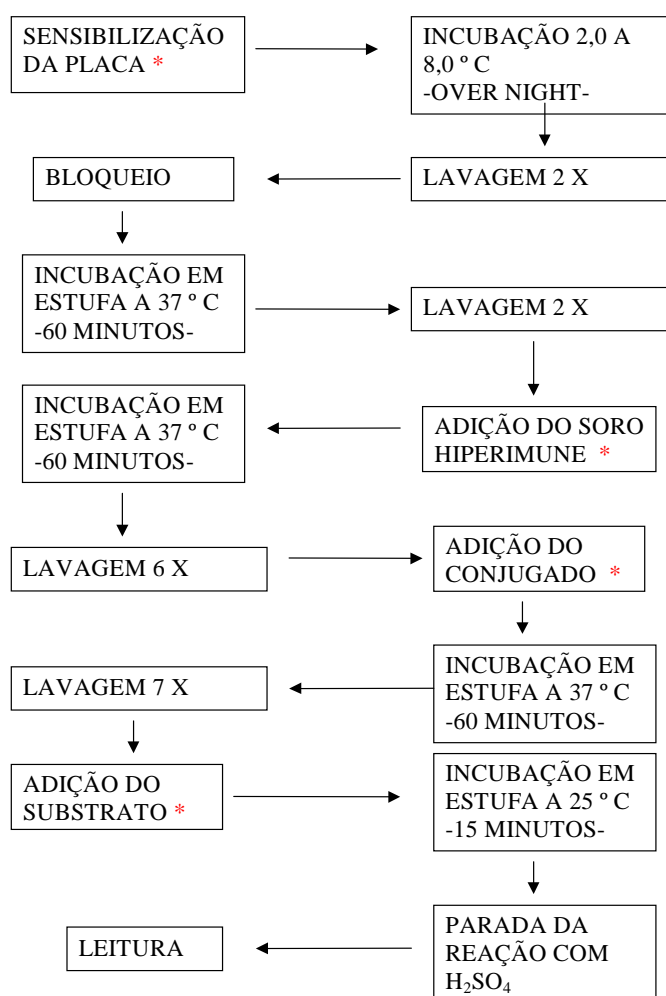


FIGURA 1 - FUXOGRAMA DAS ETAPAS DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

NOTA: No fluxograma estão assinaladas com um asterisco, as etapas que foram padronizadas no teste.

4.4.2 Cinética de Produção de Anticorpos

Os soros hiperimunes obtidos, nas diversas etapas de produção, foram titulados utilizando-se da prova ELISA padronizada na etapa anterior (4.4.) para determinar a cinética de produção de anticorpos nos coelhos imunizados.

4.5 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE MÍNIMA DE ANTÍGENO FhSE DETECTADA PELO SORO HIPERIMUNE DE COELHO ANTI-FhSE

A sensibilidade do teste ELISA para detecção de antígeno FhSE foi determinada frente a diferentes concentrações do anticorpo policlonal produzido neste estudo.

As concentrações de conjugado e de cromógenos do teste foram aqueles determinados na etapa de padronização (ver item 4.4).

4.6 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA ELISA PARA A PESQUISA DE COPROANTÍGENOS EM BUBALINOS PORTADORES DE *Fasciola hepatica*

A técnica de ELISA foi padronizada com soro hiperimune anti-antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* (FhSE), e, com o extrato aquoso de fezes de bubalinos obtido mediante a suspensão de 5 gramas de fezes em 7 ml de água destilada em tubo de ensaio, seguida por agitação em vortex por 1 minuto, com posterior centrifugação a 900 G por 10 minutos, sendo coletado o sobrenadante e conservado a – 20°C até o uso.

Na padronização da técnica ELISA foram estabelecidas: a diluição do extrato aquoso de fezes por cavidade da placa. As diluições do soro e conjugado, e as concentrações de substrato e de cromógeno.

Na padronização foram usadas placas de ELISA de fundo chato marca BIOSTER S.P.A., esterilizadas. O conjugado empregado foi anti-IgG de coelho peroxidase, molécula total (Sigma, código A-6154). O substrato e o cromógeno foram, respectivamente, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30% (Merck código 1072101000) e o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) em tabletes de 2 mg (Sigma, código p-6887).

Para determinar a sensibilidade da técnica, cavidades da placa de ELISA foram sensibilizadas com varias concentrações de extrato aquoso de fezes com fator de acréscimo de 100% até se obter o valor mínimo detectável. Para tanto, foram feitas diluições seriadas da maior para a menor concentração de antígeno, em tampão de ligação, conforme protocolo na tabela 1. O conjunto anti-IgG de coelho peroxidase (Sigma A-6154) foi usado na mesma diluição empregada na padronização do soro hiperimune de coelho. No intuito de otimizar as condições do teste, foi utilizado o volume de 200µl por cavidade do extrato de fezes, soro hiperimune e conjugado.

TABELA 1- DILUIÇÕES DOS EXTRATOS DE FEZES PARA PESQUISA DE COPROANTÍGENOS DE *FASCIOLA HEPATICA* POR ENZIMOIMUNOENSAIO.

Extrato de Fezes		Diluições dos extratos de fezes								
Pool +	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Pool +	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Pool -	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Pool -	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA NO DIAGNÓSTICO DE FASCIULOSE HEPÁTICA EM BUBALINOS.

Para o cálculo dos índices que atestam a validade dos resultados obtidos, o diagnóstico de positividade foi realizado pelo exame do fígado dos animais quando do abate dos mesmos, pelo Serviço de Inspeção Federal. Este exame é realizado mediante incisões no fígado dos animais com observação visual e por compressão e

palpação dos mesmos à procura dos parasitos nos ductos biliares, bem como de alterações na forma, coloração e consistência do parênquima. A sensibilidade e especificidade foram calculadas segundo GUIMARÃES *et al.* (1987), (Tabela 2):

TABELA 2 - ÍNDICES PARA AFERIÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE ELISA

TESTE	INSPEÇÃO FEDERAL		
	DOENTES	SADIOS	TOTAL
REAGENTE	A	C	A+C
NÃO REAGENTE	B	D	B+D
TOTAL	A+B	C+D	A+B+C+D

Onde: Sensibilidade = $A/A+B$ e Especificidade = $D/C+D$

4.8 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PRESENTES NOS ANTÍGENOS TOTAIS DE *Fasciola hepatica* E *Euritrema coelomaticum*, NO ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE *Fasciola hepatica*, E NOS EXTRATOS DE FEZES DE BUBALINOS COM *Fasciola hepatica* E DE BOVINOS COM *Euritrema coelomaticum*

A eletroforese consiste em fazer migrar qualquer íon ou grupo com carga elétrica através da aplicação de um campo elétrico, numa matriz que normalmente é um gel. A velocidade de migração da partícula depende da carga, do seu peso molecular e da intensidade do campo aplicado. Quanto maior a razão entre a carga elétrica e a massa de uma partícula mais depressa esta migrará.

Escolhe-se a malha do gel, dependendo do perfil da proteína. O grau de filtração molecular vai depender do tamanho dos poros. O tamanho efetivo dos poros varia com a concentração de acrilamida utilizada na polimerização (mais acrilamida, menor o tamanho dos poros) e também com a concentração de bis-acrilamida utilizada.

Para esta etapa do projeto, utilizamos gel de poliacrilamida numa concentração para o gel de empilhamento de 5% de poliacrilamida e para o gel de

separação numa concentração de 12% de poliacrilamida.

A amperagem aplicada durante a corrida foi de 30 mA. O tempo de corrida foi determinado pela migração do azul-de-bromofenol.

Após a corrida, o gel foi corado com solução de Azul de Coomassie por 5 minutos.

A seguir lavou-se com uma solução descorante que consistiu em uma mistura de água/metanol na proporção de 1:1, até as bandas das proteínas ficarem bem nítidas.

O gel, por fim foi conservado em uma embalagem plástica contendo glicerina/água destilada na concentração 1:1 e conservado em geladeira à temperatura de 5 e 8° C.

Foi utilizado um pente de 15 dentes, com largura, espessura e profundidade de 5, 1 e 10 mm, respectivamente. As amostras foram diluídas conforme a Tabela 3.

TABELA 3 – DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS EM TAMPÃO DE AMOSTRA

AMOSTRA	DILUIÇÃO
Soro-albumina bovina	1:2
Antígeno total de <i>Fasciola hepática</i>	1:2
Antígeno de secreção/excreção de <i>Fasciola hepatica</i> FhSE	1:1
Padrão SDS-7	Puro
Extrato de fezes de bubalinos com <i>Fasciola hepatica</i>	6:1, 3:1 e 2:1

As soluções e os procedimentos utilizados para a eletroforese estão descritos no apêndice E.

Para determinar o peso molecular das proteínas, foi construída uma curva padrão de proteínas. Na ordenada colocou-se o peso molecular das proteínas do padrão. Na abscissa colocou-se a mobilidade eletroforética (Rf) das mesmas proteínas. A mobilidade eletroforética é a distância percorrida pela proteína no gel. O resultado é uma fórmula que a partir do Rf de qualquer proteína pode determinar o seu peso molecular.

4.9 IMUNOELETTROTRANSFERÊNCIA (EITB)

A técnica de imunoeletrotransferência consistiu em realizar a transferência eletroforética de proteínas separadas por peso molecular, em um gel de SDS-PAGE, para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, com as proteínas fixadas na membrana, realizaram-se vários procedimentos envolvendo antígeno e anticorpo de forma semelhante a um teste ELISA indireto (apêndice E).

Foi avaliada a reatividade cruzada, do soro de coelho hiperimune, contra o antígeno FhSE, testando-o contra o antígeno total de *Euritrema coelomaticum*, por ser este parasito um Trematoda e ser achado frequentemente em bovinos existentes na região de onde procederam os animais estudados.

Mediante a técnica de imunoeletrotransferência, foram identificadas as frações

protéicas do antígeno FhSE e dos antígenos totais de: *Fasciola hepatica* e *Euritrema coelomaticum* reconhecidas pelo soro de coelho hiperimmune anti- antígeno FhSE. Foram também determinados os pesos moleculares das proteínas reconhecidas. Foram também identificados os coproantígenos de *Fasciola hepatica* presentes em fezes de bubalinos e os coproantígenos de *Euritrema coelomaticum* presentes em fezes de bovinos reconhecidos pelo soro de coelho hiperimmune anti- antígeno FhSE.

Foram utilizados extratos aquosos de fezes de 10 bubalinos portadores de *Fasciola hepatica* e 10 bovinos portadores de *Euritrema coelomaticum*, na proporção de 5 gramas de fezes para 7 ml de água destilada. Após agitação o extrato foi centrifugado a 900 G por 10 minutos. Juntou-se o sobrenadante dos extratos dos bubalinos e dos bovinos, formando pool, os quais foram centrifugados à 10.000 g por 15 minutos, o sobrenadantes fora então coletados e submetidos à diálise com escamas de polietilenoglicol à -20° C até uma concentração de 20 vezes em volume. Os espécimes foram então filtrados em filtro de 0,45 μ m e utilizados logo a seguir.

4.10 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência consiste na separação e identificação de substâncias utilizando-se de um aparelho chamado High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Para tanto, as substâncias a serem analisadas são dissolvidas em uma solução denominada fase móvel, que é bombeada através de uma coluna que contém uma substância porosa em seu interior. As substâncias, ao serem arrastadas por esta coluna, são separadas de acordo com características tais como polaridade, tamanho, afinidade com a coluna, hidrofobicidade, entre outras. Após o que, a fase móvel, contendo as substâncias já separadas, passa por uma cubeta onde incide radiação ultra-violeta que após atravessar a solução e ser absorvida em parte pela mesma, é então captada do lado oposto da cubeta por um detector que converte a

radiação recebida em um sinal. Este sinal é utilizado por um programa de computador para traçar um gráfico. O tempo de retenção, indicado pelo pico máximo da curva, caracteriza a substância, e a área da curva no gráfico indica a concentração da mesma. Dentre as substâncias possíveis de se analisar por estas técnicas encontram-se as proteínas. É possível utilizar-se desta técnica para a detecção direta de proteínas específicas de *Fasciola hepatica* nas fezes de bubalinos parasitados, podendo desta forma realizar-se o diagnóstico da parasitose.

Para conhecer os perfis cromatográficos dos antígenos de *Fasciola hepatica*, *Euritrema coelomaticum* e *Ascaris suum* foi realizada cromatografia usando cromatógrafo líquido da marca HP, coluna Agilent ZORBAX Bio Series GF-250, fase móvel de solução aquosa de NaCl: 130 mM, Na₂HPO₄: 20 nM e azida de sódio: 0,005%, pH 7,0 e condições cromatográficas : fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min, Temperatura: 23°. C, Detector UV: (210 nm).

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO ENZIMOIMUNOENSAIO

O soro coletado na última sangria de prova dos coelhos hiperimunizados com o antígeno FhSE foi usado para padronizar o teste imunoenzimático. O soro coletado antes da primeira imunização serviu como soro controle negativo. Obteve-se a melhor discriminação entre as diferentes concentrações de antígenos utilizadas com a diluição do soro hiper-imune em 800 vezes e a diluição do conjugado em 2.500 vezes (tabela 4).

TABELA 4 - ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA O ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE *Fasciola hepatica* RECONHECIDO PELO SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO

Concentração de antígeno (ng)	DILUIÇÃO DO SORO (X)								
	400			800			1.600		
	DILUIÇÃO DO CONJUGADO (X)								
	2.500	3.750	5.625	2.500	3.750	5.625	2.500	3.750	5.625
1.000	1,461	0,993	0,607	1,171	0,792	0,509	0,920	0,669	0,417
500	1,375	0,982	0,604	1,089	0,782	0,468	0,913	0,646	0,366
250	1,310	0,963	0,597	0,951	0,722	0,427	0,810	0,615	0,315
125	1,086	0,941	0,483	0,724	0,637	0,288	0,702	0,593	0,234

Os valores de absorvância do soro pré-imunização variaram de 0,027 a 0,051.

Na padronização do teste ELISA usando anticorpo policlonal e antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* FhSE, a melhor concentração de antígeno foi de 250 ng/ml, a melhor diluição do soro foi de 1/800, a melhor diluição do conjugado foi de 1/2500, cromógeno na concentração de 0,2 mg/ml, a quantidade ideal das soluções de antígeno, anticorpos, conjugado e cromógenos por pocinho foi de 200 µl.

5.2 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O ANTÍGENO FHSE

Na tabela 5 estão relacionados o período de imunização as colheitas de sangue e sangria de produção do anticorpo policlonal obtido nos animais inoculados com o antígeno FhSE.

TABELA 5 – PERÍODO DE IMUNIZAÇÃO E SANGRIAS REALIZADAS

Período de Imunização	Inoculação de antígeno	Sangria de prova	Sangria de produção
0	1 ^a . dose	Sim	Não
15		Sim	Não
30	2 ^a . dose	Sim	Não
45	3 ^a . dose	Sim	Não
60		Sim	Não
67		Não	Sim

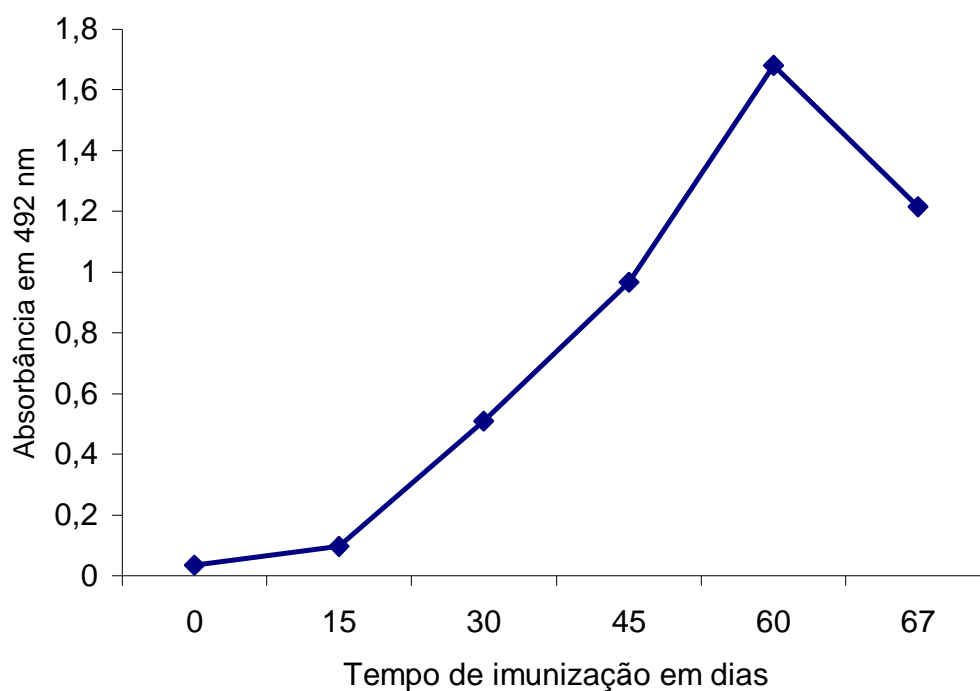


FIGURA 2– CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE IgG CONTRA *Fasciola hepatica* EM COELHOS

Ao analisar a cinética de produção de anticorpos contra o antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* FhSE verifica-se que a produção máxima ocorreu 60 dias após a primeira imunização dos coelhos (Figura 2).

5.3 PESQUISA DE ANTÍGENO

Entre as 10 concentrações de antígenos analisadas (327.680 a 640 picogramas), verificou-se que a quantidade mínima de antígeno detectada pelo teste foi de 5.120 picogramas (Tabela 6).

TABELA 6 - QUANTIDADE MÍNIMA DE ANTÍGENO FHSE DETECTADA PELO SORO DE COELHO IMUNIZADO COM O ANTÍGENO FHSE

ANTÍGENO EM PICOGRAMAS/CAVIDADE	ABSORBÂNCIA
327.680	1,244
163.840	0,832
81.920	0,552
40.960	0,312
20.480	0,191
10.240	0,161
5.120	0,140
2.560	0,055
1.280	0,054
640	0,050

5.3.1 Pesquisa de Coproantígenos por Titulação em Bloco

Para pesquisa de coproantígenos foram testadas várias diluições. Num primeiro tempo, utilizou-se um pool de extratos de fezes de bubalinos com *Fasciola hepatica* (controle positivo) e outro pool de extrato de fezes de animais sem *Fasciola hepatica* (controle negativo). O teste ELISA foi realizado nas condições já estabelecidas (Tabela 4 e item 4.4.). Realizou-se o teste também com soro de coelho hiperimune anti-antígeno total de *Fasciola hepatica* (Figuras 3 e 4).

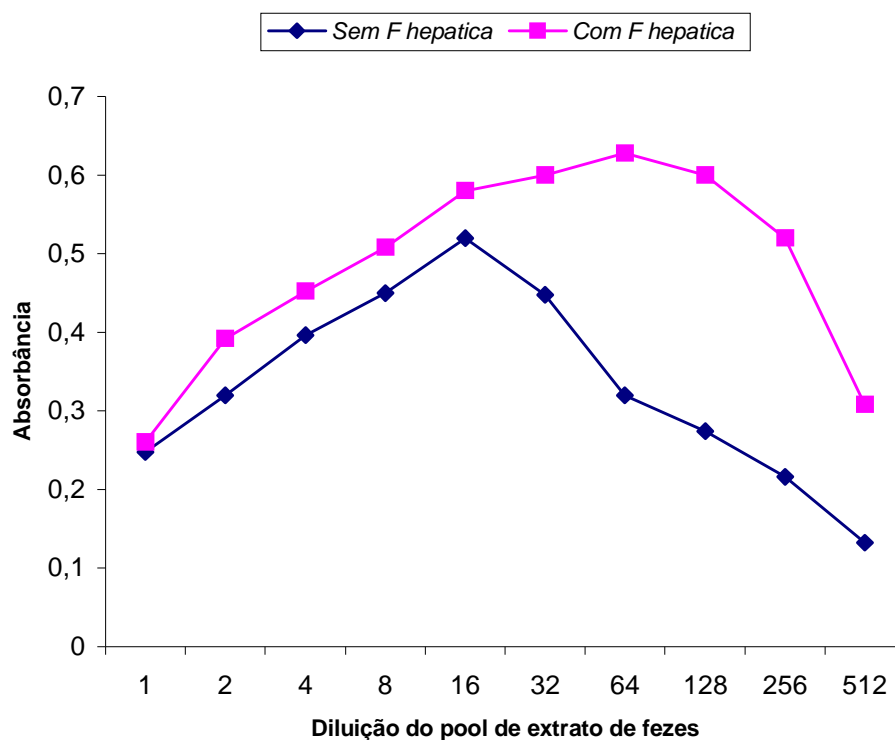


FIGURA 3 – PESQUISA DE COPROANTÍGENO DE *Fasciola hepatica* EM FEZES DE BUBALINOS USANDO POOL DE FEZES DE ANIMAIS COM *F hepatica* E POOL DE FEZES DE ANIMAIS SEM *F hepatica* FRENTE AO SORO HIPERIMUNE DE COELHOS CONTRA ANTÍGENO DE SECREÇÃO E EXCREÇÃO DE *Fasciola hepatica*.

O anticorpo policlonal anti Ag FhSE nas condições empregadas, discriminou melhor os animais positivos dos negativos para *F. hepatica* do que o anticorpo policlonal contra o Ag total de *Fasciola hepatica*.

Dentre as 10 diluições analisadas, as diluições de 1:64, 1:128 e 1:256 foram as que discriminaram melhor entre animais reagentes e não reagentes.

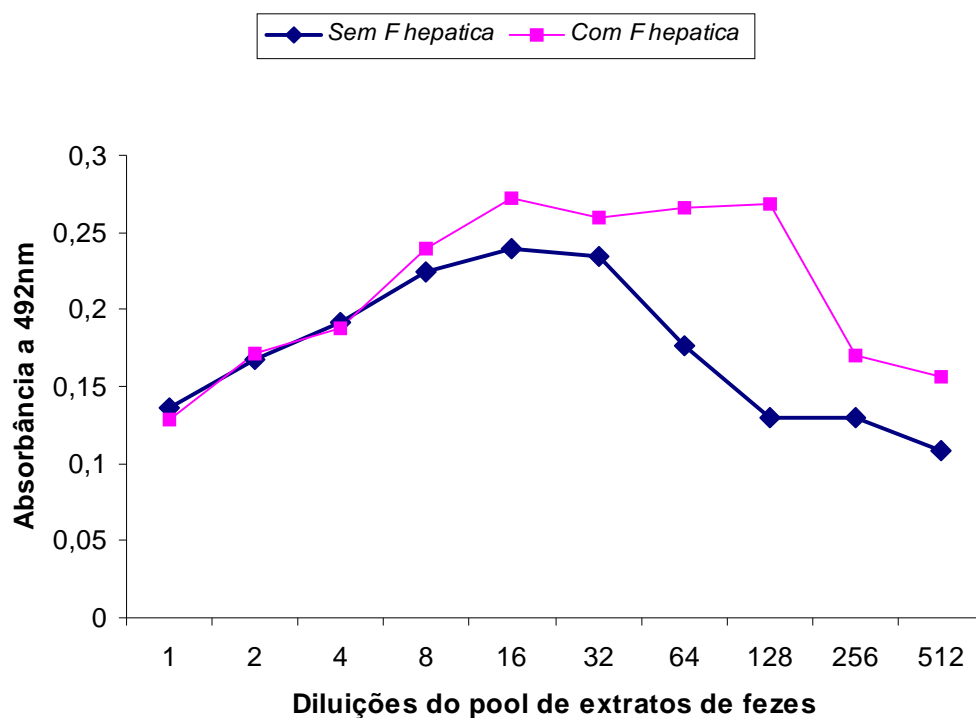


FIGURA 4 - PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA USANDO EXTRATO DE FEZES DE BUBALINOS CONTROLES COM *F hepatica* E SEM *F hepatica* PARA A PESQUISA DE COPROANTÍGENOS DE *Fasciola hepatica* UTILIZANDO SORO ANTI-ANTÍGENO TOTAL DO PARASITO

5.3.2 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CORTE DA REAÇÃO

Para estabelecer o ponto de corte (*cut off*) entre animais reagentes e não reagentes, para o teste ELISA na pesquisa de coproantígenos de *F. hepatica*, foram utilizadas 10 amostras de animais não portadores do parasito.

O teste ELISA, foi realizado conforme padronização anterior, utilizando o anticorpo policlonal anti-antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* (FhSE) (Figura 5).

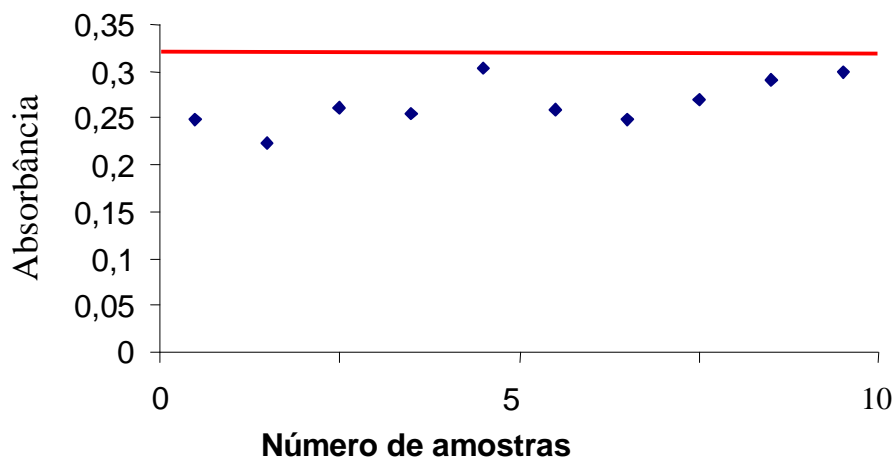


FIGURA 5 – DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CORTE ENTRE ANIMAIS REAGENTES DE NÃO REAGENTES *CUT OFF*

Trabalhou-se com duplicatas das amostras dos soros. A partir das Absorbâncias obtidas foram calculadas as médias e o desvio padrão da média. O ponto de corte foi estabelecido como o valor da média acrescida de dois desvios padrão da média (DP). Os resultados obtidos foram os seguintes:

- Média Aritmética = 0,26665
- Desvio Padrão da média = 0,025156
- Ponto de corte = média + 2 Desvios Padrão da Média

Ponto de corte = 0,317.

O valor de absorbância do nível de corte da reação discriminando entre animais reagentes e não reagentes, em leitura realizada a 492 nm, foi de 0,317.

5.3.3 Pesquisa de Coproantígenos de Secreção/Excreção de *Fasciola hepatica* FhSE em Bubalinos

Para a pesquisa de coproantígeno foi usado “pool” de fezes de bubalinos coletadas em frigorífico, no período de 20 de março a 04 de julho de 2004. A pesquisa de coproantígenos de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* FhSE foi realizada em uma população de bubalinos naturalmente infectada e com alta prevalência de

fasciolose e foi comparada população de animais isentos de *Fasciola hepatica* procedentes de área indene (população 3). O grupo de animais com *Fasciola hepatica* era oriundo de Guaratuba, Paraná e o sem *Fasciola hepatica*, oriundo de São João do Triunfo, Paraná. Os resultados obtidos estão expressos na figura 6.

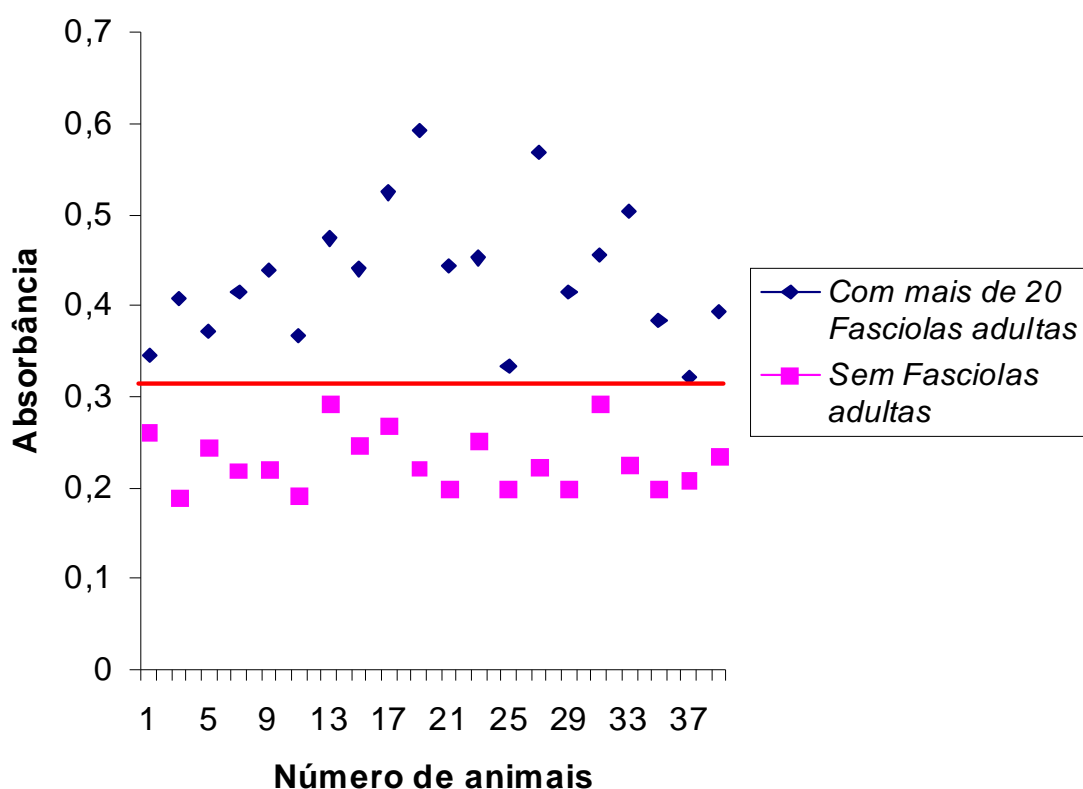


FIGURA 6 – ABSORBÂNCIA VERIFICADA MEDIANTE PESQUISA DE COPROANTÍGENOS POR TESTE ELISA, COM ANTICORPO CONTRA ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE *Fasciola hepatica*, EM BUBALINOS COM MAIS DE 20 EXEMPLARES DE *F. hepatica* ADULTOS NO FÍGADO E 20 BUBALINOS SEM *F. hepatica*

A sensibilidade do teste ELISA foi de 95% e a especificidade foi de 100% quando comparados os dois lotes de animais conhecidos, procedentes um de zona de transmissão e outro de zona indene.

Os valores de absorbância variaram de 0,32 a 0,58 nos animais com *Fasciola hepatica* e 0,18 à 0,3 para os animais sem *Fasciola hepatica*.

5.3.4 Pesquisa de Coproantígenos de *Fasciola hepatica* em Rebanhos de Diversos Índices de Prevalência da Parasitose (População 4)

Os valores de absorbância variaram de 0,15 a 0,62 nos animais com *Fasciola hepatica* e 0,1 à 0,42 para os animais sem *Fasciola hepatica*. Quatro animais sem *Fasciola hepatica* apresentaram-se soro reagentes com valores acima do cut-off.(figura 7).

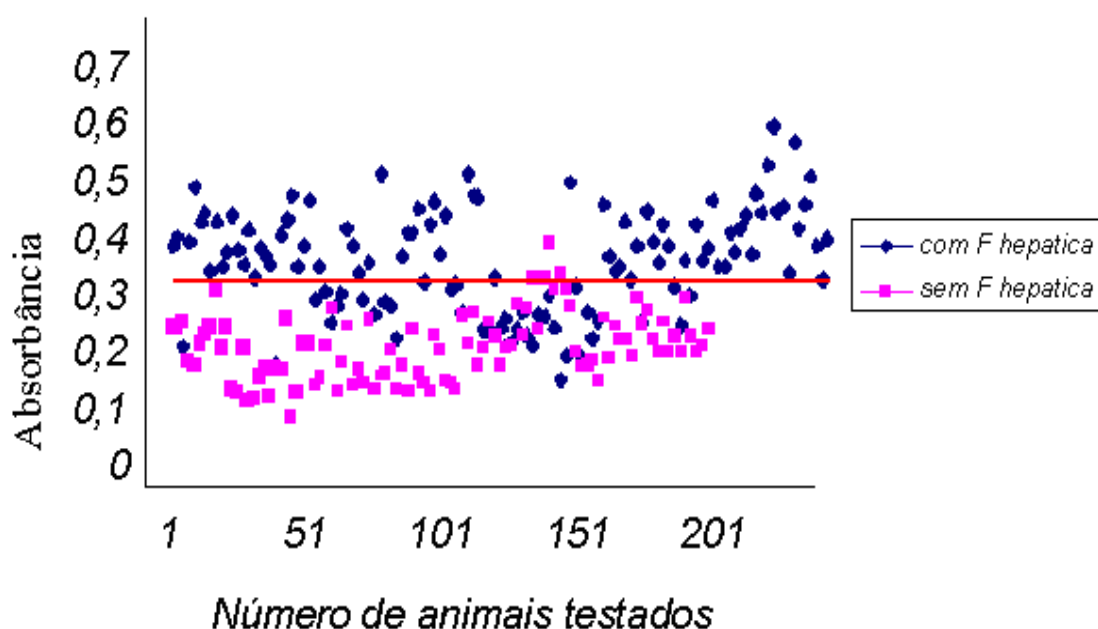


FIGURA 7 – ABSORBÂNCIA VERIFICADA NA PESQUISA DE COPROANTÍGENOS, POR TESTE ELISA, COM ANTICORPO POLICLONAL, EM AMOSTRAGEM DE FEZES DE 220 BUBALINOS, COLETADA EM FRIGORÍFICO

Quando a pesquisa de coproantígeno foi realizada em rebanhos com prevalência variada de fasciolose hepatica, a sensibilidade da prova foi de 68% e a especificidade de 96% em relação ao padrão ouro que foi a inspeção.

Para o teste ELISA usando anticorpo policlonal e antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* FhSE, a melhor concentração de antígeno é de

250 ng/ml, a melhor diluição do soro é de 1/800, a melhor diluição do conjugado é de 1/2500, a melhor concentração é 0,2 mg/ml, e, a quantidade ideal das soluções de antígeno, anticorpos, conjugado e cromógeno por cavidade da placa é de 200 µl.

5.4 IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA

5.4.1 Perfil Eletroforético das Proteínas Presentes no Antígeno Total de *Fasciola hepatica* e no Antígeno de Secreção/Excreção (FhSE) do Parasito

Utilizando a técnica de eletroforese em SDS page comparou-se os perfis eletroforéticos dos antígenos de *Fasciola hepatica* (antígeno total do parasito e antígeno de secreção/excreção FhSE), da soroalbumina bovina e do marcador de peso molecular SDS 7, (Figura 8).

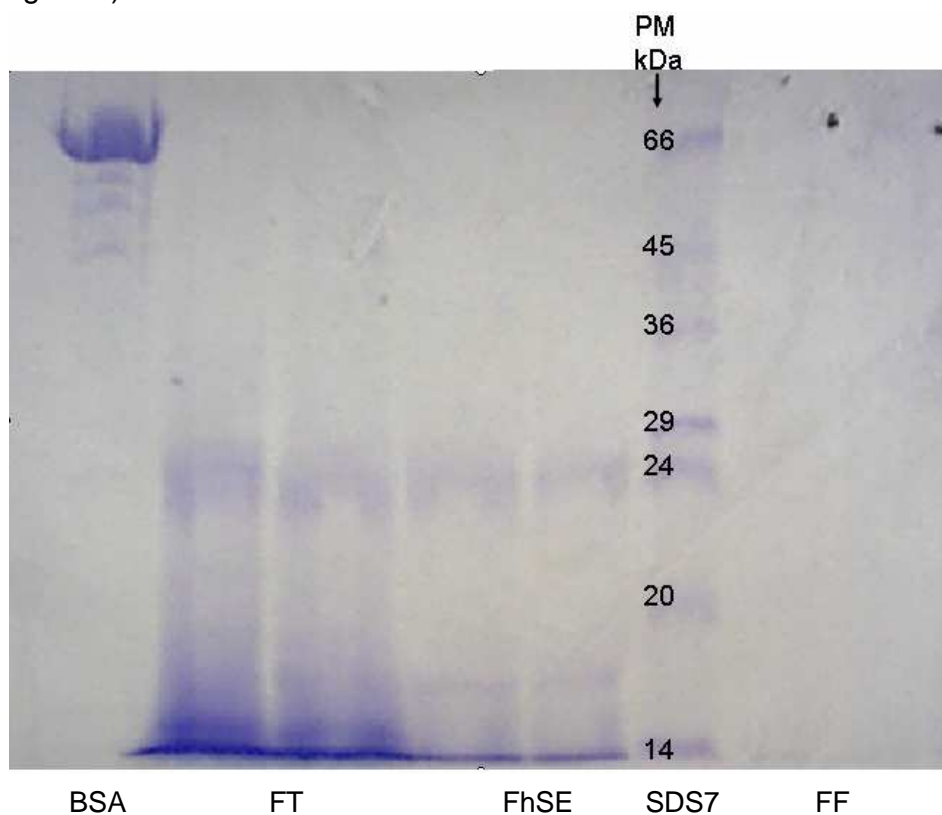


FIGURA 8 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ANTÍGENOS DE *Fasciola hepatica* (AG FT E AG FHSE), E EXTRATO DE FEZES DE BUBALINOS COM *Fasciola hepatica* (FF), MARCADORES PM: SOROALBUMINA BOVINA (BSA) E SDS7

Os pesos moleculares das proteínas do antígeno de secreção/excreção FhSE de *Fasciola hepatica*, detectadas por eletroforese foram: 16 kDa e 26 kDa, enquanto que os de antígeno total do parasito foram: 13kDa, 16 kDa e 26 kDa.

5.4.2 Perfil Eletroforético, das Proteínas Presentes nos Antígenos Totais de *F. hepatica* e *E. coelomaticum*, no Antígeno de Secreção/Excreção de *F. hepatica*, e nos Extratos de Fezes de Bubalinos com *F. hepatica* e de Bovinos com *E. coelomaticum*

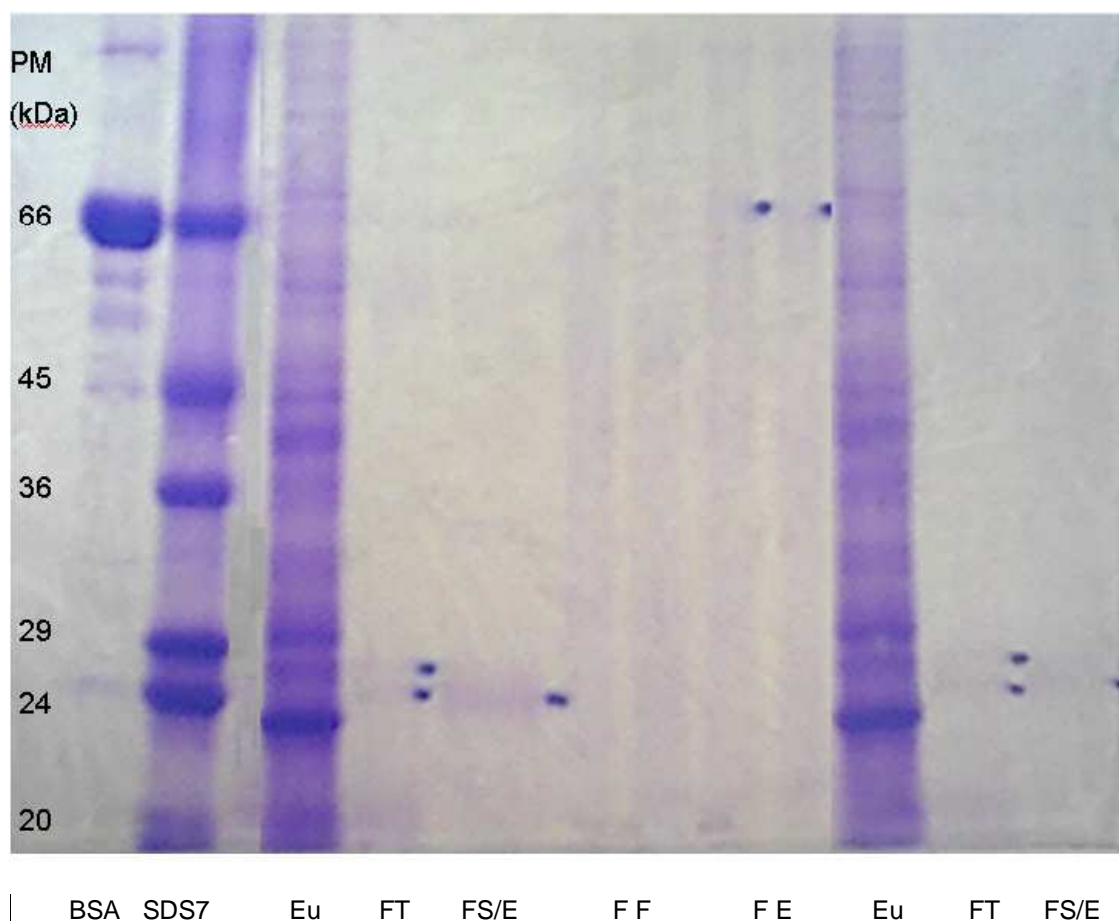


FIGURA 9 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE ANTÍGENOS DE *Fasciola hepatica* (ANTÍGENO TOTAL - FT), *Fasciola hepatica* (ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO - FS/E), E *Eurytrema coelomaticum* - EU, E EXTRATOS DE FEZES DE BUBALINOS COM *Fasciola hepatica* - FF, E DE BOVINOS COM *Eurytrema coelomaticum* - FE, COMPARADOS COM O MARCADOR DE PESO MOLECULAR SDS 7 E A SOROALBUMINA BOVINA - BSA, EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Observou-se que o extrato total de *Euritrema coelomaticum* revelou à eletroforese pelo menos 20 proteínas, cujos pesos moleculares variaram de 14 à 105 kDa (Figura 9).

Como as proteínas reveladas pelos extratos de fezes eram fracas, concentrou-se os extratos de fezes 20 vezes, realizando-se nova eletroforese, e, então, a imunoelectrotransferência.

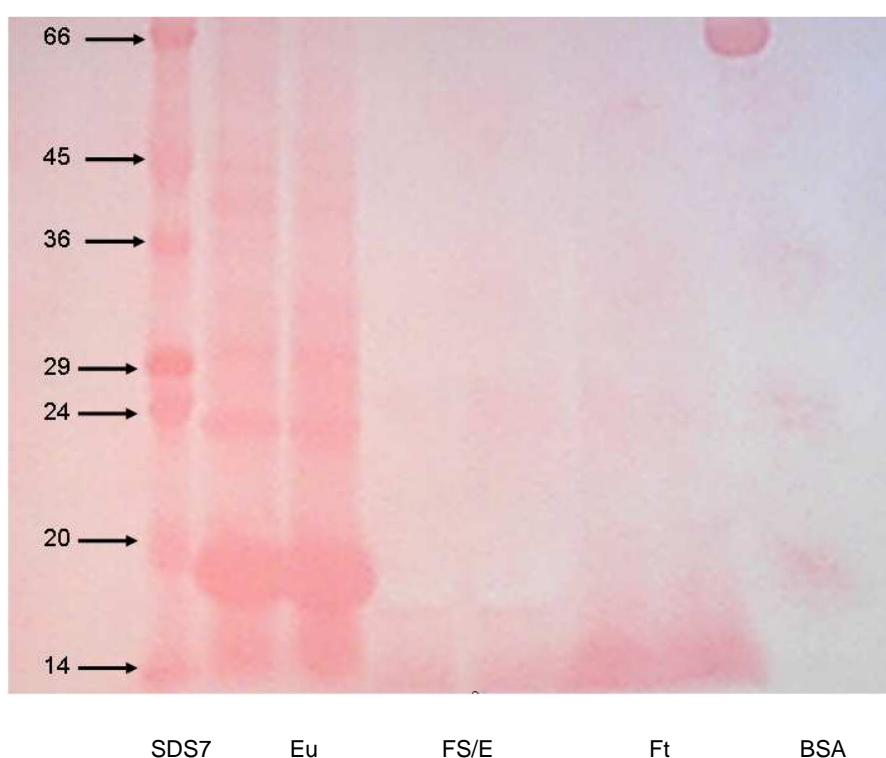


FIGURA 10 – RESULTADO DA TRANSFERÊNCIA DOS ANTÍGENOS DE *Euritrema coelomaticum* EU, *Fasciola hepatica* (ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO FS/E E ANTÍGENO TOTAL FT) PARA A NITROCELULOSE, CORADO PELO PONCEAU S.

Após a transferência para membrana de nitrocelulose coradas pelo corante de Ponceau, observou-se que o Ag de *Euritrema* “Eu”, apresentou várias proteínas, algumas muito intensas enquanto que os antígenos de *Fasciola hepatica* (antígeno total “FT”, e antígeno de secreção/excreção FS/E) apresentaram poucas proteínas. SDS7, é o padrão molecular e BSA é a soroalbumina bovina (Figura 10).

5.4.3 Identificação, Mediante Imunoeletrotransferência, das Frações Antigênicas Presentes nos Antígenos Totais de *Fasciola hepatica*, E *Euritrema coelomaticum*, e nos Extratos de Fezes de Bubalinos com *Fasciola hepatica* e Bovinos com *Euritrema coelomaticum* Reconhecidas pelo Soro de Coelho Hiperimune Anti-Antígeno Total e Anti-Antígeno de Secreção/Excreção de *Fasciola hepatica*

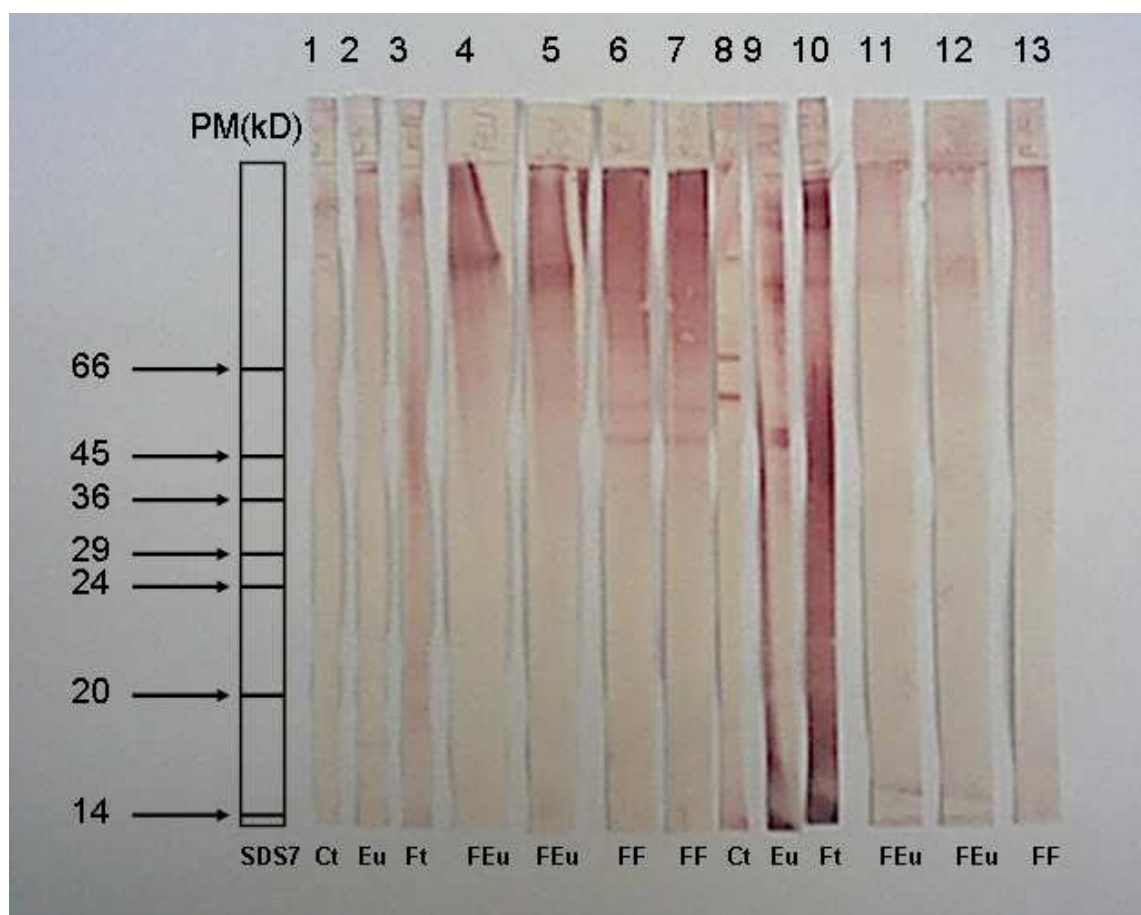


FIGURA 11 – PROTEÍNAS DE *Fasciola hepatica* - FT, E *Euritrema coelomaticum* – EU, REVELADAS PELO SORO HIPER-IMUNE ANTI-ANTÍGENOS TOTAL – T, E DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO – S/E DE *Fasciola hepatica* NOS ANTÍGENOS (EU E FT) E NAS FEZES (FEU, FF) DE ANIMAIS PARASITADOS

Na figura 11, as linhas de 1 a 7 compreendem amostras incubadas com soro de coelho hiperimune anti-Ag S/E de *Fasciola hepatica* S/E, e o segundo grupo

compreendido pelas seis últimas linhas (8 – 13) foi incubado com soro de coelho hiperimune anti-Ag Total de *Fasciola hepatica* - T. As duas primeiras amostras de cada série correspondem a extratos antigênicos com antígenos totais de *Euritrema coelomaticum* - Eu e *Fasciola hepatica* - FT. Observa-se que, com relação aos três extratos antigênicos testados, se revelaram mais bandas protéicas no segundo grupo. Verificou-se também que existem diferenças entre os perfis dos três parasitos comparados. No que se refere aos extratos de fezes houve maior reatividade no primeiro grupo sendo que o perfil entre os animais com *Fasciola* e com *Euritrema* foi diferente um do outro. Apesar da quantidade de proteínas observadas na eletroforese após a transferência, somente algumas foram reveladas com o soro hiperimune anti-antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica*.

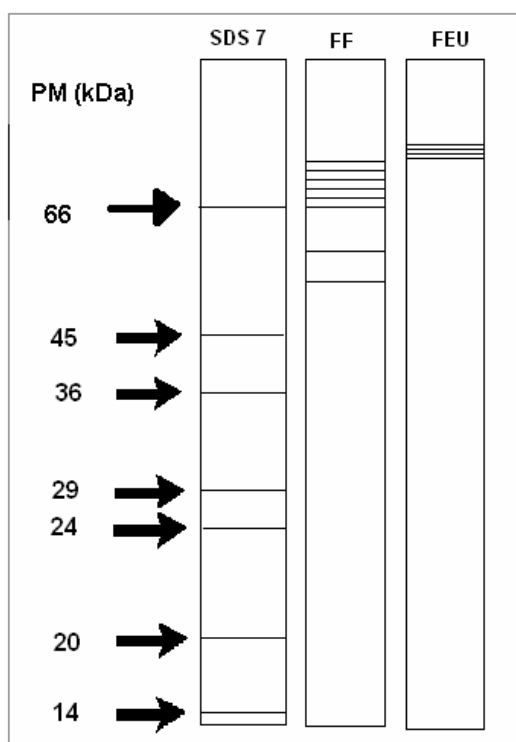


FIGURA 12 – COPROANTÍGENOS DE *Euritrema coelomaticum* E *Fasciola hepatica*
REVELADOS MEDIANTE EITB COM SORO HIPERIMUNE ANTI -ANTÍGENO FHSE

As fezes de bubalinos com *Fasciola hepatica* submetidas à EITB, revelaram

mediante reação antígeno-anticorpo, com o anticorpo policlonal anti Ag FhSE proteínas com os seguintes pesos moleculares: 55, 60, 66, 69, 71, 74, 76 e 79 kDa. As fezes de bovinos com *Euritrema coelomaticum* submetidas à EITB, revelaram mediante reação antígeno-anticorpo, com o anticorpo policlonal anti Ag FhSE somente proteínas com pesos moleculares: 80, 82, 83 e 84 kDa (Figuras 11 e 12).

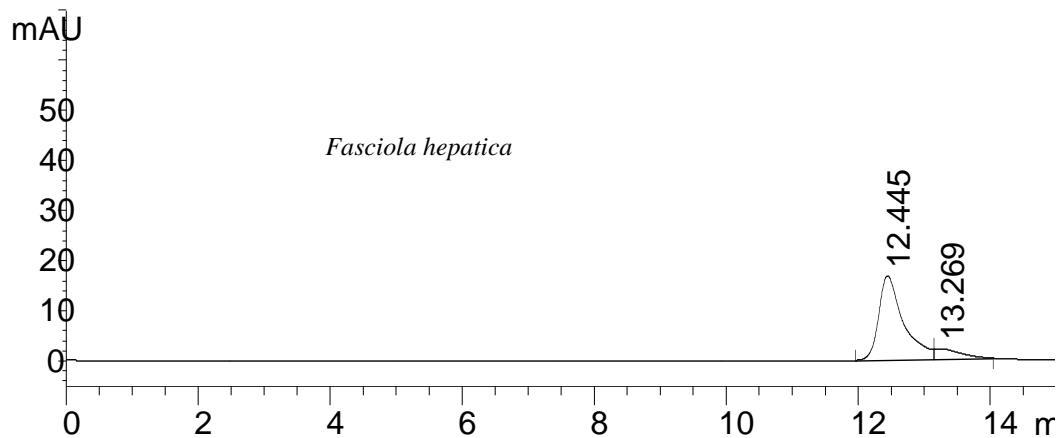
5.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

5.5.1. Comparação, mediante a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta (uv), dos perfis cromatográficos dos antígenos obtidos de *Fasciola hepatica*, *Euritrema coelomaticum* e *Ascaris suum*.

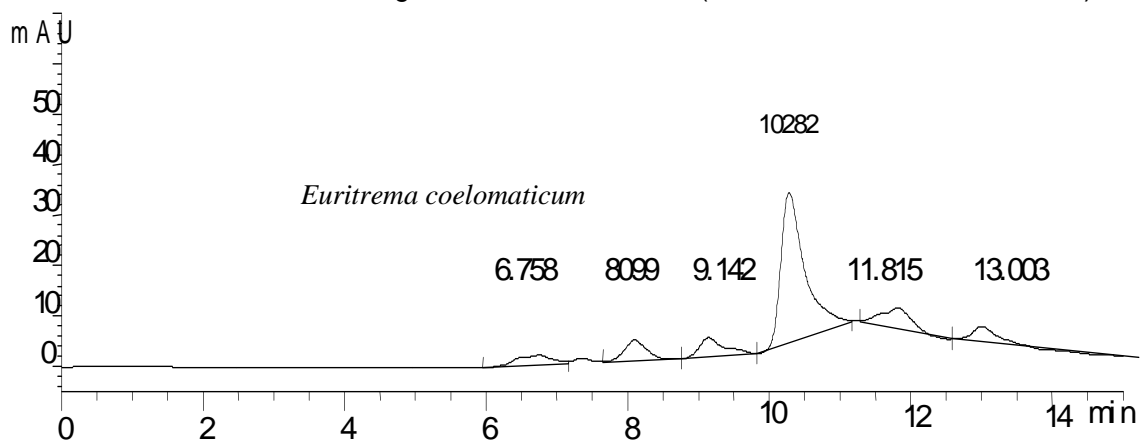
Após filtrar os extratos antigênicos dos parasitos em membrana de 0,22 µm de poro, procedeu-se à diluição dos mesmos em fase móvel e injetou-se no cromatógrafo. Graças à utilização da cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta foi possível comparar os perfis cromatográficos dos antígenos obtidos de *Fasciola hepatica*, *Euritrema coelomaticum* e *Ascaris suum*. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência utilizada revelou diferenças cromatográficas entre os extratos com antígenos totais dos parasitos estudados (Figura 13).

Realizou-se comparação entre o perfil cromatográfico do antígeno total de *Fasciola hepatica* e o antígeno de secreção/excreção do parasito (FhSE). Observou-se que em ambos os cromatogramas, houve um pico no tempo de retenção de 12,4 minutos, indicando uma proteína comum a ambos os extratos antigênicos do parasito, observou-se também que o maior pico ocorreu no cromatograma realizado com o extrato dos produtos de secreção/excreção do parasito (FhSE) (figura 14). A proteína referente ao pico foi denominada proteína 1 (figura 14).

VWD1 A, Wavelength=210 nm, TT (TESTE\AGO21000.D)



VWD1 A, Wavelength=210 nm, TT (TESTE\NOV06005.D)



VWD1 A, Wavelength=210 nm, TT (TESTE\NOV06007.D)

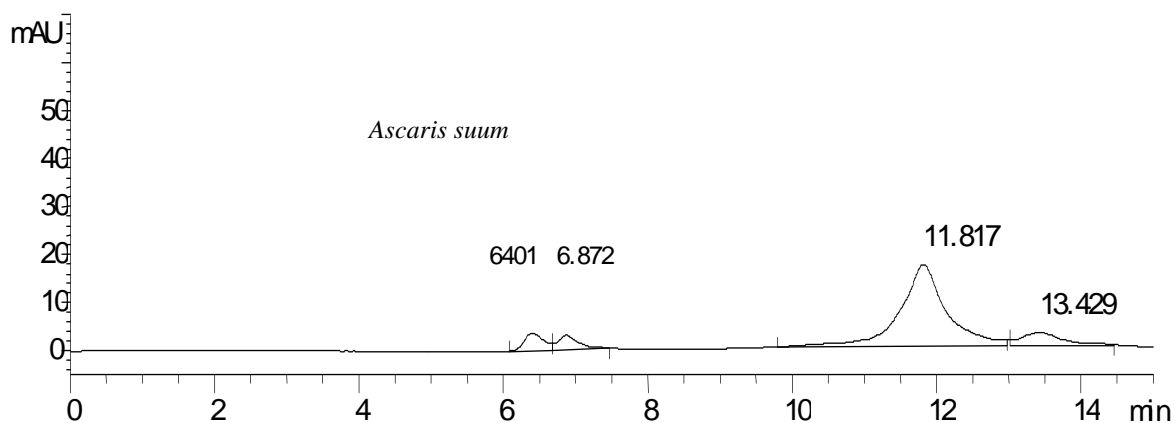


FIGURA 13 – PERFIL CROMATOGRÁFICO (DE CIMA PARA BAIXO) DE ANTÍGENOS DE *Fasciola hepatica*, *Euritrema coelomaticum*, E *Ascaris suum*

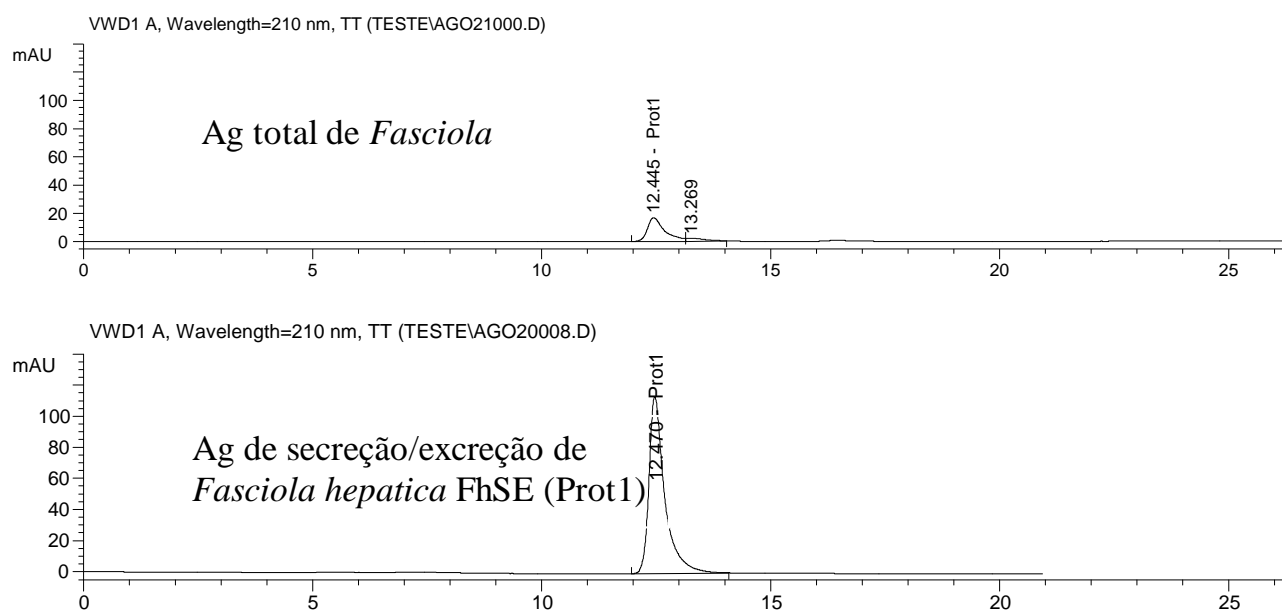


FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS DE ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE *Fasciola hepatica* FHSE, DENOMINADO PADRÃO PROT1, COMPARADO COM CROMATOGRAMA DO ANTÍGENO TOTAL DO PARASITO

5.5.2 Comparação entre os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência, resultados do teste ELISA e da inspeção federal, no diagnóstico da fasciolose hepática em bubalinos.

Utilizando como padrão o antígeno de secreção/excreção de *F. hepatica* FhSE, denominado de Prot1 (Figura 14), analisou-se com o uso da cromatografia os extratos de fezes de três grupos de três bubalinos, dois com positividade para *F. hepatica* pela inspeção e pelo ELISA (Figuras 15 e 16), e um com negatividade para ambos os casos (Figura 17).

Observou-se também outros picos que são devidos a outras proteínas presentes nas fezes dos bubalinos e que são característicos deste material (perfil característico da matriz), repetindo-se em todos os cromatogramas.

O formato dos picos da proteína nas amostras de fezes é ocasionado pela coeluição das referidas proteínas da matriz, conforme aparecem nos animais negativos (Fig. 7).

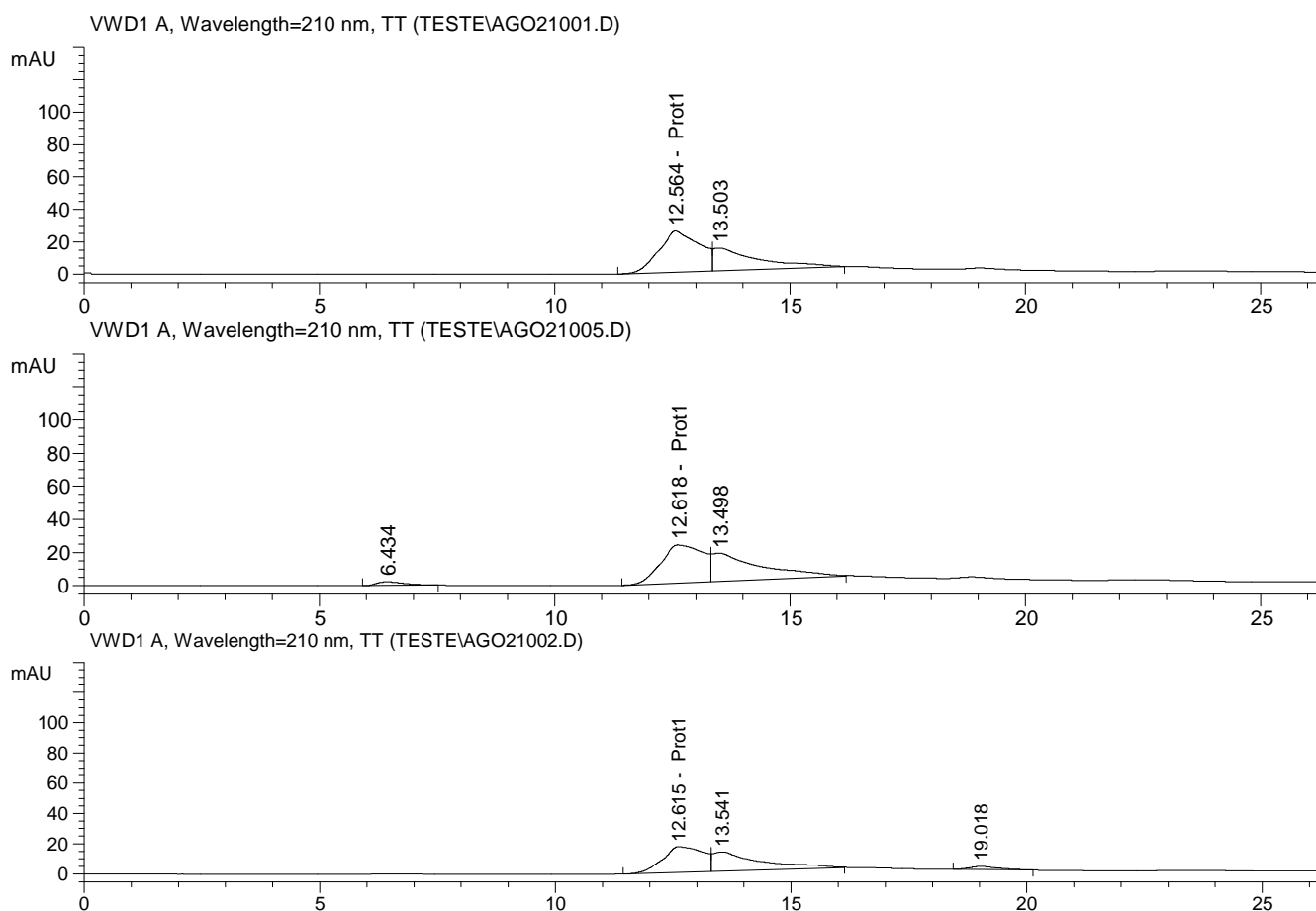


FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE FEZES DE TRÊS BUBALINOS POSITIVOS PARA *Fasciola hepatica* À INSPEÇÃO E QUE MOSTRARAM ALTA REATIVIDADE (POSITIVIDADE) NO TESTE ELISA

A figura 15 demonstra o reconhecimento nos três cromatogramas da proteína utilizada como padrão (Prot 1), no tempo de retenção de 12,4 a 12,6 minutos.

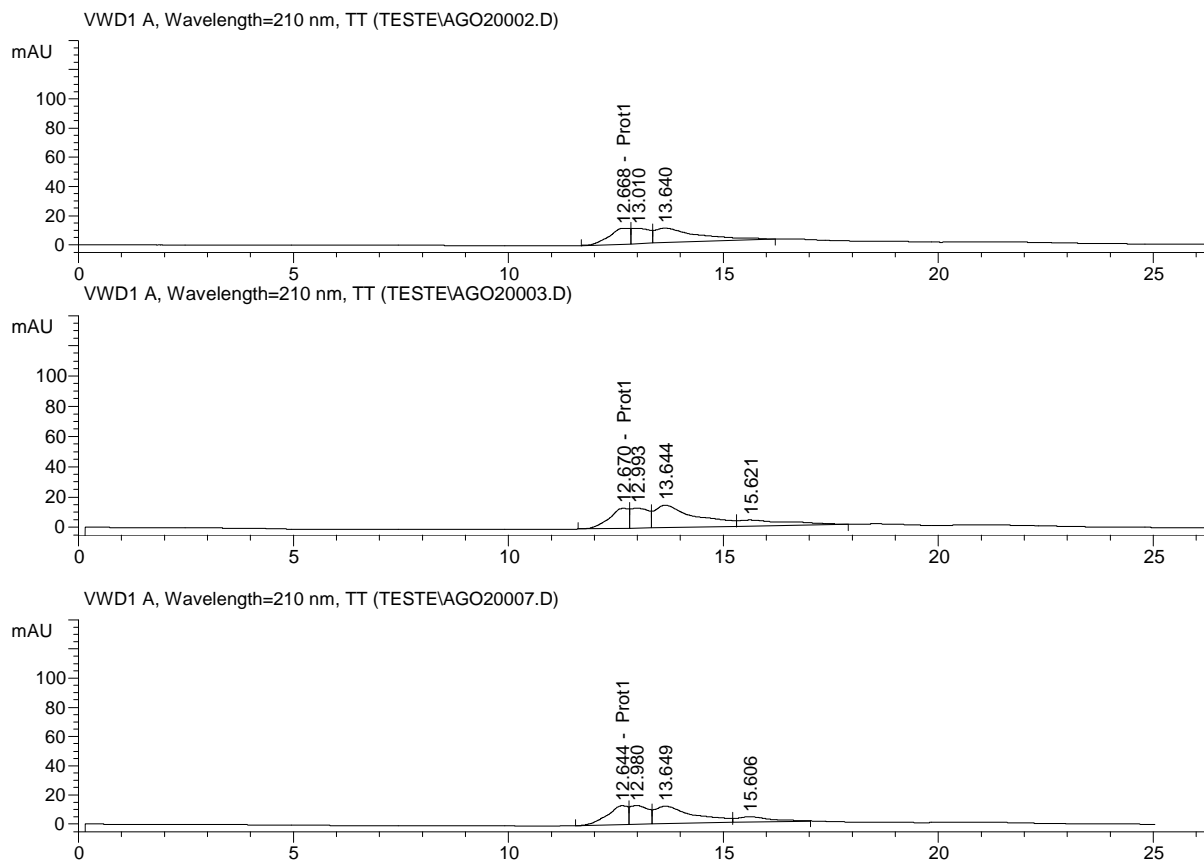


FIGURA 16 - CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE FEZES DE TRÊS BUBALINOS POSITIVOS PARA *Fasciola hepatica* À INSPEÇÃO E QUE MOSTRARAM MÉDIA REATIVIDADE NO TESTE ELISA.

Na figura 16, observa-se o reconhecimento da Prot1 nos cromatogramas, embora o pico seja menor que os da figura 15, provavelmente em função da menor quantidade de proteína presente na amostra, o que deve ter também ocasionado menor reatividade no teste ELISA.

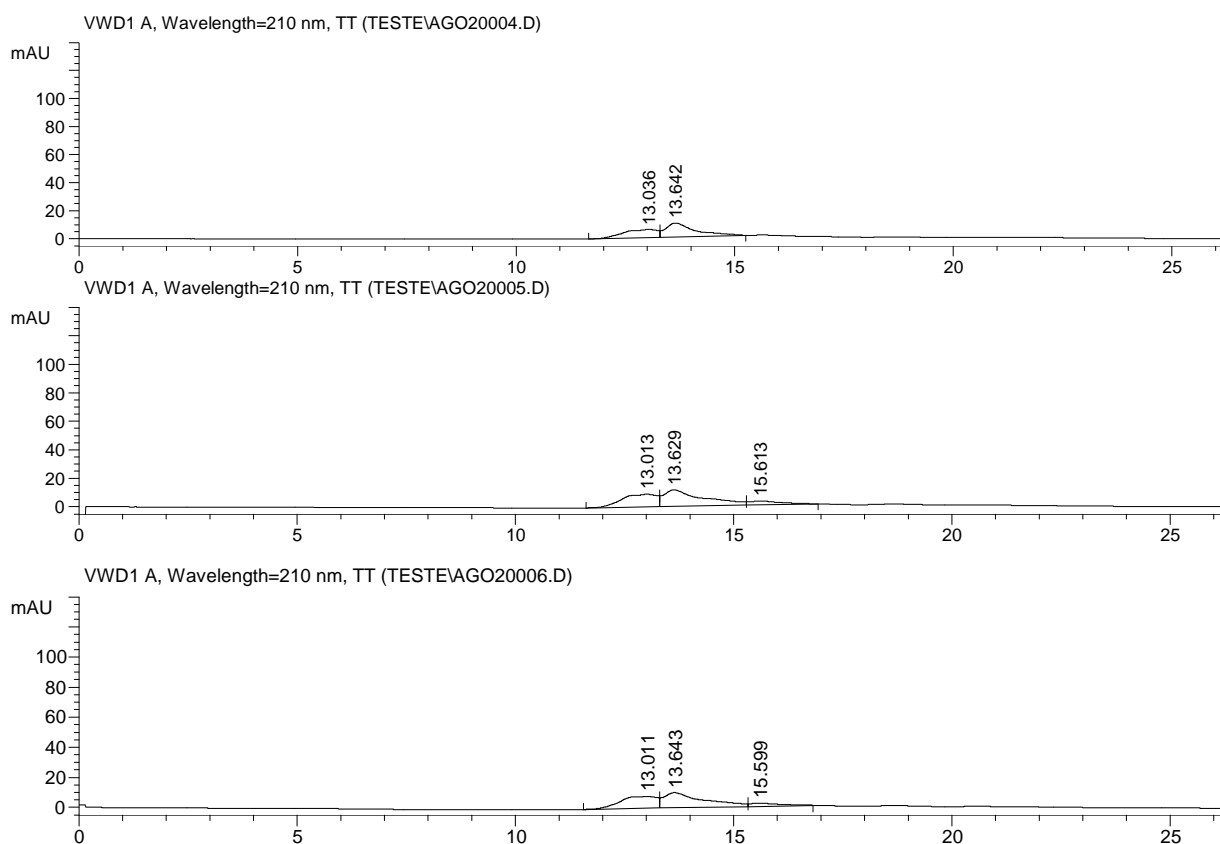


FIGURA 17 – CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE FEZES DE TRÊS BUBALINOS NEGATIVOS PARA *Fasciola hepatica* À INSPEÇÃO E QUE MOSTRARAM BAIXA REATIVIDADE NO TESTE ELISA

A Prot1 não aparece no cromatograma (Figura 17), dando resultado coincidente com a inspeção e com o teste ELISA.

Quando aplicada aos extratos de fezes de animais parasitados e não parasitados por *Fasciola hepatica*, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência permitiu discriminar uns e outros, pelo aparecimento do pico no tempo de retenção compreendido entre 12,4 e 12,7 minutos, correspondente à Prot1, nas amostras de animais positivos à inspeção, e com média e alta reatividade no teste de ELISA.

Obs: em exames cromatográficos, a variação aceita como normal é de até 5% no tempo de retenção da substância.

6 DISCUSSÃO

Em relatos da literatura mundial pesquisada das duas últimas décadas não há trabalho sobre diagnóstico imunoparasitológico de *Fasciola hepatica* em *Bubalus bubalis* por ELISA. Também não há diagnóstico mediante imunoeletrotransferência ou cromatografia líquida de alta eficiência.

O teste ELISA padronizado no presente trabalho é constituído de anticorpos policlonais produzidos contra um antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica*, FhSE, em coelhos, e trata-se de uma prova indireta, que pesquisa coproantígenos e que utiliza um anti-anticorpo (conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase), encontrado comercialmente.

O teste ELISA padronizado para a pesquisa de coproantígenos quando aplicado a 40 bubalinos, 20 não portadores de *Fasciola hepatica* e 20 com o parasito em quantidade superior a 20 espécimes por cabeça, apresentou sensibilidade de 95% comparável aos 95,3% obtido por CASTRO *et al.* (1994), e especificidade de 100%, comparável aos 99% segundo os autores, para 293 bovinos utilizando o *kit* ELISA Fascidig, com anticorpo monoclonal. Também comparável ao obtido por DUMÉNIGO *et al.* (1998) para 40 ovinos que descrevem 95% de sensibilidade e 100% de especificidade, usando o Ac. monoclonal ES78.

Quando aplicado a 220 bubalinos, de diversas procedências e prevalências, o teste apresentou sensibilidade de 68% e especificidade de 96%, superior aos resultados obtidos por GORMAN *et al.* (1991) para cordeiros a campo no Chile que observaram 60% de sensibilidade e 70% de especificidade; e superior aos 60% obtidos por CASTRO *et al.* (1994) utilizando o teste ELISA com anticorpo monoclonal, para rebanhos bovinos com baixa prevalência do parasito.

A possível causa para algumas amostras negativas ao exame de inspeção

terem dado resultado positivo no teste ELISA, teria sido a presença de parasitas, em quantidade suficiente para positivar o teste, que passaram despercebidos à inspeção .

Amostras positivas à inspeção, mas que deram resultado negativo no teste ELISA (falso negativo) pode ter como explicação a presença de parasitas, que foram visíveis no momento da inspeção, mas não apresentaram anticorpos em níveis detectáveis.

O teste ELISA utilizando o anticorpo policlonal anti-FhSE discriminou melhor os animais com e sem *Fasciola hepatica* comparado ao anti-antígeno total do parasito, resultado similar ao encontrado por O'NEIL *et al.* (1998) aplicando um teste ELISA com antígenos de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* e antígeno bruto do parasito para a detecção de anticorpos no soro de 95 pessoas, onde o antígeno de secreção/excreção discriminou melhor as pessoas parasitadas das não parasitadas.

Da maneira como foi padronizado o teste, quando aplicado em rebanho a campo apresentou menor sensibilidade (68%). Entretanto, manteve sua especificidade (96%). A quantidade de parasitas nos ductos biliares parece ser um fator determinante para a resposta do teste.

Nos trabalhos das últimas décadas sobre reconhecimento da fração proteica de *Fasciola hepatica* pelas técnicas de ELISA, eletroforese e EITB, não foi feita nenhuma referência ou comparação entre aqueles e a fração proteica de *Euritrema coelomaticum*. Tal trematoda apresenta alta prevalência em rebanhos de bovinos das regiões pesquisadas, ocorrendo também em bubalinos.

Vários autores estudaram o antígeno bruto e o antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica*, encontrando fração proteica cujo peso molecular variou de 9 a 136 kDa. MERCADO (1989), HILLYER e SOLER (1988), OLDHAM (1983), HILLYER *et al.* (1992), SAMPAIO-SILVA *et al.* (1996), SHAKER *et al.* (1994a), SILVA *et al.* (1993), HAMMAMI *et al.* (1997), CORDOVA *et al.* (1997), DIAZ *et al.* (1998), O'NEIL *et al.*

(1998), TENDLER *et al.* (1998) e FREDES *et al.* (2001) (Apêndice k).

As técnicas de eletroforese em SDS-PAGE e imunoeletrotransferência utilizadas revelaram diferenças de peso molecular entre os parasitos estudados: *F. hepatica* e *E. coelomaticum*, bem como nos extratos de fezes de bubalino com *F. hepatica* e bovino com *E. coelomaticum*, sendo que para a revelação dos coproantígenos de ambos os parasitos, o soro hiperimune anti-FhSE se mostrou mais eficaz, enquanto que para a revelação dos antígenos dos extratos totais dos parasitos, o mais eficaz foi o soro anti-Ag total de *F. hepatica*.

As fezes de bubalinos com *Fasciola hepatica* submetidas a EITB, revelaram com reação antígeno-anticorpo, com o anticorpo policlonal anti Ag FhSE proteínas com pesos moleculares que variaram de 55 kDa à 79 kDa, a saber: 55 kDa; conforme ao encontrado por DÍAZ *et al.* (1998) 55-57 kDa, 66 kDa; segundo Mercado (1989) 66 kDa e Díaz *et al.* (1998) 65-71 kDa, 69 kDa; de acordo com os achados de Díaz *et al.* (1998) 65-71 kDa, 71 kDa; de acordo com o encontrado por Díaz *et al.* (1998) 71 kDa, 74, 76 e 79 kDa próximo ao encontrado por SILVA *et al.* (1993) 75-84 kDa (Apêndice K), enquanto que, as fezes de bovinos com *Euritrema coelomaticum* revelaram proteínas com pesos moleculares de 80 kDa e 84 kDa, fica com esses dados patente que pela técnica de EITB utilizando-se o anticorpo policlonal anti-FhSE, é possível diferenciar os animais portadores de fasciolose dos portadores de euritrematose.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência utilizada, revelou diferenças cromatográficas entre os extratos com antígenos totais dos parasitos estudados: *Fasciola hepatica*, *Euritrema coelomaticum*, e *Ascaris suum*. Quando aplicada aos extratos de fezes de animais parasitados e não parasitados por *Fasciola hepatica*, discriminou uns e outros pela ocorrência de um pico de proteína (Prot1).

A pesquisa de coproantígeno é um exame não invasivo, que não encontra oposição do doente em sua realização e que não necessita de pessoal especializado

para a coleta de material para exame. Embora tenha sido realizada pesquisa com bubalinos, em função das técnicas desenvolvidas pesquisarem a presença de proteínas de secreção e excreção do parasito no hospedeiro parasitado, tais técnicas, com a devida adaptação podem ser aplicadas para o diagnóstico e estudo da parasitose em diversas espécies animais, inclusive na espécie humana.

Os resultados obtidos para a pesquisa de coproantígenos de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* em bubalinos pelas técnicas de ELISA e EITB, permitem vislumbrar o caminho para a padronização de um teste efetivo, para o preparo e utilização em seres humanos que possa ser disponibilizada aos laboratórios de saúde pública, podendo servir como valioso exame complementar ao diagnóstico da fasciolose hepática, doença, que como se pode ver pela literatura compulsada chega a índices tão elevados quanto os 13,5% encontrados por CORNEJO *et al.* (2003), na província de Chupaca-Junin no Peru, constituindo-se neste caso em um problema de Saúde Pública.

Além da importância para o diagnóstico, tais testes se revestiriam de especial importância no monitoramento das pessoas submetidas a tratamento, visto serem algumas das drogas utilizadas bastante tóxicas, sendo necessário saber se o tratamento surtiu o efeito esperado.

7 CONCLUSÕES

1) Para a pesquisa de coproantígeno de *Fasciola hepatica* em bubalinos, por qualquer uma das duas técnicas desenvolvidas, a utilização de antígeno FhSE e/ou de seu respectivo anticorpo policlonal, mostra-se superior à utilização do antígeno total do parasito e/ou o anticorpo policlonal respectivo.

2) O teste ELISA desenvolvido para a detecção de coproantígeno, mostra alta sensibilidade e especificidade (95% e 100% respectivamente) quando aplicado a rebanho com alta prevalência da doença. A sensibilidade do teste é menor (68%) quando este é aplicado a rebanhos de baixa prevalência, mas a especificidade do mesmo permanece elevada (96%).

3) Coproantígenos de *Fasciola hepatica* podem ser evidenciados mediante o emprego de técnica de EITB utilizando-se, para a revelação dos mesmos, anticorpo policlonal anti-antígeno de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* (FhSE).

4) *Euritrema coelomaticum* pode ser diferenciado de *Fasciola hepatica* através da imunoeletrotransferência, bem como os animais portadores de uma e outra parasitose, mediante pesquisa de coproantígenos.

5) A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência revelou diferentes perfis cromatográficos entre os extratos com antígenos totais de *Fasciola hepatica*, *Euritrema coelomaticum* e *Ascaris suum*.

6) Proteínas de secreção/excreção de *Fasciola hepatica* podem ser evidenciadas diretamente, mediante o emprego de técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

7) Os dois testes imunológicos empregados para o diagnóstico de fasciolose hepática em bubalinos mediante a pesquisa de coproantígenos mostraram-se promissores.

8 PERSPECTIVAS

Uma linha de pesquisa para dar seguimento a este estudo, é a utilização da cistatina como ligante das cisteinil proteinases da *Fasciola hepatica* presentes nas fezes. Isto permitirá a utilização do extrato bruto de fezes sem a necessidade de purificação nem de diluição, para a pesquisa destes antígenos altamente específicos e que têm permitido a realização de técnicas de alta sensibilidade e especificidade para a pesquisa de anticorpos anti-*Fasciola hepatica* no soro sangüíneo de seres humanos, mas que apresenta nas técnicas atualmente utilizadas de pesquisa de anticorpos, a limitação de não discriminar entre uma doença passada ou presente.

Outra pode ser a padronização de um teste ELISA sanduíche, que utilize um duplo anticorpo, ou seja, um soro de coelho hiperimune anti-*Fasciola hepatica* para sensibilizar a placa, o extrato puro de fezes para ligar os antígenos no soro fixado e um soro de ovelha hiperimune anti-*Fasciola hepatica* para ligar o conjunto formado, podendo, neste caso, o conjugado utilizado para a revelação ser o anti-IgG de ovelha peroxidase. Pela utilização do soro de ovelha para sensibilizar e o de coelho para ligar, utilizar-se-á então o conjugado anti IgG peroxidase de coelho. Isto talvez possa permitir a utilização do extrato puro de fezes e não 128 vezes diluído como é necessário para a técnica que foi experimentada. Desta forma, a quantidade de antígeno capturada deve ser suficiente para proporcionar um maior gradiente entre as absorbâncias dos espécimes dos animais positivos em comparação aos negativos.

Uma forma de melhorar o teste, seria purificar os anticorpos policlonais obtidos, selecionando os anticorpos IgG₄, que são os anticorpos predominantes na infecção que proporcionam uma boa diferença de absorbância entre os animais positivos e negativos para a parasitose, e montar com eles um kit IgG₄ ELISA.

Como a cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se promissora como

técnica para testes diagnósticos e confirmatórios da fasciolose hepática em bubalinos, mostra-se importante a realização de testes da sua utilização para o diagnóstico de parasitoses de interesse em saúde animal e em saúde humana.

Outra possibilidade é testar o emprego da imunocromatografia, para a pesquisa de coproantígenos de *Fasciola hepatica* baseada na técnica utilizada por Escalante *et al.* (2001) para ao diagnóstico da infecção por *Taenia solium* em *Mesocricetus auratus*. Esta técnica pode ser aplicada na forma de um *kit* para uso em qualquer local, sem a necessidade de leitor especial, pois a leitura se dá a olho nu, e a reação leva de 5 a 15 minutos.

REFERÊNCIAS

ABDEL RAHMAN, S.; O'-REILLY, K. L.; MALONE, J. B. Biochemical characterization and localization of *Fasciola hepatica* 26-28 kDa diagnostic coproantigen. **Parasite. Immunol.(Oxf.)**, v. 21, n. 6, p. 279-86, 1999.

AMATO, S.B.; REZENDE, H.E.B.; GOMES, D.C.; SERRA FREIRE, N.M.; ARAÚJO, J.L.B. Epidemiologia da Fasciolose hepática no Vale do Paraíba. Resultado do 1º ano de estudo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 7.: 1982, Porto Alegre. **Resumos....** Porto Alegre, 1982. p. 35.

ATLAS, A. Fasciolosis. In: PARASITOLOGIA médica. Chile : Mediterrâneo, 1991. p. 334-340.

BOSTELMANN, S. C. W.; LUZ, E.; THOMAZ SOCCOL, V.; CÍRIO, S. M. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Arch. Vet. Sci.**, Curitiba, n. 5, p. 95-100, 2000.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, n. 72, p. 248-54, 1976.

BUSETTI, E. T. Helminthos parasitos de *Bubalus bubalis* no Estado do Paraná – Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p. 399-404, 1983.

BUSETTI, E. T.; PASKE, A.; GARCIA, E. Incidência parasitária em *Bubalus bubalis* L. Curitiba, Pr. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v. 24, n. 3, p. 397-398, 1981.

CARNEVALE, S; RODRÍGUES, M. I.; SANTILLÁN G.; LABBÉ, J. H.; CABRERA, M. G.; BELLEGARDE E. J.; VELÁSQUEZ, J. N.; TRGOVICIC J.E.; GUARNERA E. A. Immunodiagnosis of human fasciolosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Micro-ÉLISA. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, DC., n. 8, p. 174-177, jan. 2001.

CASTRO, J., DUMENIGO, B.; ESPINO, A. Detección de coproantígenos para evaluar infección activa por *Fasciola hepatica* en ganado bovino. **Parasitol. Dia**, Santiago, n. 18, p. 33-38, 1994.

CHIRIBOGA, J.; BENDEZU, P.; FRAME, A. ***Fasciola hepatica* en los mataderos de Puerto Rico**. San Juan : Biomedical Science PR. Department of Health U.P.R. School of Medicine and Inter American University, 1974.

CORDERO, M. ROJO F., MARTÍNEZ A.; SÁNCHEZ M.; FERNÁNDEZ S.; NAVARRETE, I.; DIEZ, P.; QUIROZ, H.; CARVALHO, M. **Parasitologia veterinária**. Madrid : Mcgraw-Hill Interamericana, 1999. p.260-262.

CORDOVA, M.; HERRERA, P.; NOPO, L.; BELLATIN, J.; NAQUIRA, C.; GUERRA, H.; ESPINOZA, J. *Fasciola hepatica* cystein proteinases: immunodominant antigen in human fascioliasis (Abstract). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, n. 77, p. 660-666, 1997.

CORNEJO, W. et al. Immunodiagnóstico de la fasciolosis humana em la provincia de Chupaca-Junin, mediante un ELISA de captura basado en cistatina. **An. Fac. Med. Univ. Nac. Mayor San Marcos**, Lima, v.64, n. 4, p. 252-4, 2003.

CORNELISSEN, J. B.; GAASENBEEK, P. H.; BORGSTEEDE, F. H.; HOLLAND, W.; HARMSEN, M.; BOERSMA, W. et al. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, n. 31, p. 728-737, 2001.

COURTIN, S.; ALCAÍNO, H.; FERRIERE, G. Plathelminfos del conejo Silvestre (*Oryctolagus cuniculus*) en la cordillera de Nahuelbuta, Chile. **Arch. Med. Vet.**, Valdivia, n. 11, p. 23-26, 1979.

CRAIG, C. F.; FAUST, E.C. **Parasitologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1945. 941 p.

DAN, M.; LICHTENSTEIN, D.; LAVOCHKIN, J.; STARROROWSKI, M.; JEDWAB, M.; SHIBOLET, S. Human fasciolosis in Israel. An imported case. Israel, **Isr. Jour. Med. Sci.**, n. 17, p. 430-432, 1981 (citado por MAS-COMA, S.; BARGUES, M.; ESTEBAN, J.

Human Fasciolosis 1999. **In:** Fasciolosis. DALTON, J. P. New York, USA : CABI, p .411-434).

DÍAZ, A.; LI-ELIAS, O.; OTERO, O.; GRACÍA, C.; ESPINO, A. Et al. Identificación, mediante Western Blot, de Inmunógenos de *Fasciola hepatica*, reconocidos por los sueros de ratas infectadas experimentalmente. **Rev Cuba. Med. Trop.**, Habana, v. 50, n. 1, p.12-17, 1998.

DUMÉNIGO RIPOLL, B. E.; VILLALVILLA, C. M. F. Detección y cuantificación de coproantígenos de *Fasciola hepatica* en ganado ovino. **Rev Cuba. Med. Trop.**, Habana, v. 50, n. 1, p. 82-84, 1998.

DUMÉNIGO, B.; ESPINO, A.; FINLAY, C.; MEZA, M. Kinetics of antibody based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, n. 86, p.23-31, 1999.

DUNN, A. Helminología veterinaria. 2.ed. México : El Manual Moderno. [s.d.]. p. 112-137, 1983.

ESCALANTE, H. A.; OBED HUAMANCHAY, C.; KELLY DAVELOIS, A. La inmunocromatografía para el diagnóstico de la infección por *Taenia solium* en *Mesocricetus auratus* mediante la detección de coproantígenos. **Rev. Med. Exp.**, Lima, n. 18, p. 3-4, 2001.

ESPINO, A.; DUMENIGO, B.; FERNANDEZ, R.; FINLAY, C. et al Immunodiagnosis of human fasciolosis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretory-secretory products. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v. 37, n. 3, p. 605-608, 1987.

ESPINO, A.; PADRON, L.; DUMENIGO, A.; LAFERTE, J. UltramicroELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG en pacientes con fascioliasis. **Rev. Cuba. Med. Trop.**, Habana, v. 49, n. 3, p. 167-173, 1997.

ESPINO, A. M.; FINLAY, C. M. Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n. 1, p. 190-193, jan. 1994.

ESPINO, A.; BORGES, A.; DUMENIGO, B. Fecal antigens of *Fasciola hepatica* potentially useful in the diagnosis of fascioliasis. (Abstract). **Rev. Panam. Salud Publica.**, Washington, n. 7, p. 225-231, 2000.

ESPINO, A.; MARCET, R.; FINLAY, C. Detection of circulating excretory secretory antigens in human fasciolosis by sandwich enzyme linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n. 12, p. 2637-2640, 1990.

ESTEBAN, J. G.; BARGUEZ, M. D.; MAS-COMA, S. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fasciolosis, a review. **Res. Rev. Paras.**, n. 58, p. 13-48, 1998 (citado por MAS-COMA, M.; ESTEBAN, J.; BARGUES, M. Epidemiología de la fasciolosis humana: revisión y propuesta de nueva clasificación. **Bull. World Health Org.**, n. 77, p. 340-346, 1999.)

EUZEBY, J. **Helminthoses of domestic animals.** Paris: Vigot Frères, 1971. 798 p.

FAUST, E.C.; RUSSEL, P.F.; JUNG, R.C. **Parasitologia Clínica.** São Paulo: Salvat, 1974. 943 p.

FERNANDES, B.F. **Parasitas de animais domésticos no Paraná.** Curitiba, 1965. 41 f. Tese (Livre docência) - Curso de Veterinária. Universidade Federal do Paraná.

FERNANDES, B.F.; HAMANN, W. Considerações sobre a verminose em bovinos e bubalinos no Litoral Paranaense. **Rev. Set. Cienc. Agrar.** , Curitiba, n. 7, p. 137-140, 1985.

FREDES, F.; SÁNCHEZ, C.; GORMAN, T.; ALCAÍNO, H. Purificación de antígenos de *Fasciola hepatica* mediante electroelución y su aplicación inmunodiagnóstica mediante Western Blot em la infección animal. **Parasitol. Dia**, Santiago, v. 25, n. 1-2, p. 19-23, 2001.

FREDES, F. La fasciolosis animal y humana. **Mon. Electr. Patol. Vet.**, Santiago de Chile, n. 1, p. 38-67, 2004.

GIOVANNONI, M. e KUBIAK, G.V.L. Fauna parasitológica IV: Lista prévia da ocorrência de helmintos em animais domésticos. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, n.2, p. 225-232, 1947.

GIRÃO, E. S.; UENO, H. Técnica de Quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.20, n.8, p. 905-912, 1985.

GUIMARÃES, M. C.; COUTINHO, S. G.; ANTUNES, C. M. F. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 55-58, 1987.

GOMES, P. A. C.; NUERNBERG, S.; NETO, M. P. et al. Infecção experimental de *Lymnaea columella* Say, 1817, com *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, de ocorrência no Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Univ. Fed. Rural Rio J.**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 35-38, 1974.

GONZALES, H. Perdas económicas producidas por las parasitosis de los rumiantes. In: JORNADAS MÉDICO VETERINÁRIAS, 8.:1982, Valdivia. **Anais ... Valdivia** : Universidad Austral de Chile, 1982. p. 39-48.

GORMAN, T., MORENO, P., LORCA, M., IBARRA, L., ALCAÍNO, H. Inmunodiagnóstico de la fasciolosis animal mediante una prueba inmunoenzimática (ELISA). **Parasitol. Dia**, Santiago, n. 15, p. 87-93, 1991a.

HAMMAMI, H.; AYADI, A.; CAMUS, D.; DUTROIT, E. Diagnostic value of the demonstration of specific antigen of *Fasciola hepatica* by Western Blot Technique. **Parasite**, Paris, n. 4, p. 291-295, 1997.

HILLYER, G.; SOLER DE GALANES, M. Identification of a 17 kDa *Fasciola hepatica* immunodiagnostic antigen by the enzyme-linked immunotransfer blot technique. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, n. 26, p. 2048-2053, 1988.

HILLYER, G.; SOLER, M.; RODRIGUEZ, J.; BJORLAND, J.; SILVA, M.; RAMÍREZ, S.; BRYAN, R. Use of the Falcom assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (fast-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, n. 46, p. 603-609, 1992.

HILLYER, G. Serological diagnosis of *Fasciola hepatica*. **Parasitol. Dia**, Santiago, n. 17, p. 130-136, 1993.

HILLYER, G. Comparison of purified 12 kDa and recombinant 15 kDa *Fasciola hepatica* antigens related to a *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n. 90, p. 249-253, 1995.

HILLYER, G. Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. In: DALTON, J.P. **Fasciolosis**. New York : CABI, 1999. p. 435-447.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rico J. publ. Health Trop. Med., a. 9: p. 283-289, 1934.

JEMLI, M. H.; ESCOULA, L.; MAGNAVAL, J. F.; DORCHIES, P. Exploration de la réponse immunitaire chez l'agneau infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica*. **Rev. Med. Vet.**, Toulouse, n. 143, p. 355-360, 1992.

KARNAUKHOVA, V. K. **The life-span of *Fasciola* in man**. Med. Par. Biol, 1978. (citado por MAS-COMA, S.; BARGUES, M.; ESTEBAN, J. 1999. Human Fasciolosis. In: Dalton, J.P. Fasciolosis. New York, USA : CABI, p. 411-434).

KHALIL, G.; ABDEL, T.; MAKLAD, M. Kh.; ABDALLAH, Hm.; FAHMY I. A.; ELZAYYAT E. A. Specificity of crude and purified *Fasciola* antigen in immunodiagnosis of human fasciolosis. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, Cairo, n. 20, p. 87-93, 1990.

LUZ, E.; QUEIROZ, V. da S.; LEITE, L. C. Perfil epidemiológico da *Fasciola hepatica* numa propriedade na cidade de Bocaiúva do Sul. **Arch. Vet. Sci.**, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 54, 1996.

LUZ, E.; GAZDA, C. M.; YADA, R. S. Fasciolose animal no Estado do Paraná - análise de dados. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v. 35, n. 4, p. 777-780, dez. 1992.

LUZ, E.; VIEIRA, A. M.; CESAR, T. C.. Aspectos biológicos de *Lymnaea columella* SAY, 1817, *Physa cubensis* PFEIFFER, 1839 e *Physa marmorata* GUILDING, 1828 (*Molusca-Pulmonata*) no Primeiro Planalto e Litoral Paranaense. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v. 37, n. 3, p. 667-671, set. 1994.

MAHER, K.; EL REDI, R.; EL HODA, A.; EL GHANNAM, M.; SHAHEEN, H.; SHAKER, Z.; HASSANEIN, H. Parasite-specific antibody profile in human fasciolosis: application for immunodiagnosis of infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, n. 61, p. 738-742, 1999.

MARTINEZ, A.; MARTINEZ-CRUZ M. S.; MARTINEZ, F. J.; GUTIERREZ, P. N.; HERNANDEZ, S. Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, n. 72, p. 247-252, 1996.

MAS-COMA, M.; ESTEBAN, J. BARGUES, M. Epidemiologia de la fasciolosis humana: revisión y propuesta de nueva clasificación. **Bull. World Health Org.**, New York, n. 77, p. 340-346, 1999a.

MAS-COMA, M.; BARGUES, M.; ESTEBAN, J. Human Fasciolosis. 1999b. In: DALTON, J. P. **Fasciolosis**. New York: CABI., p. 411-434, 1999b.

MATTOS, M. J. T.; UENO, H.; GONÇALVES, P. C.; et al. Ocorrência estacional e bioecologia de *Lymnaea columella* Say, 1817 (*Mollusca, Lymnaeidae*) em habitat natural no Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Med Vet.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 6, p. 248-251, 1997.

MERCADO, R. Detección de péptidos immunoreactivos de *Fasciola hepatica* com sueros de personas infectadas mediante enzimoimmunoeleetrotransferência. **Bol. Chil. Parasitol.**, Santiago, n. 44, p. 86-88, 1989.

MINOZZO, J. C. **Imunoeletrotransferência e enzimoimunoensaio como ferramentas para o imunodiagnóstico da neurocisticercose.** Curitiba, 2003. Dissertação (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná.

MORALES, M. A., LUENGO, J., VÁSQUEZ, J. Distribución y tendència de la fasciolosis em ganado de abasto de Chile, 1989-1995. **Parasitol. Dia.**, Santiago, n. 24, p. 115-118, 2000.

NEVEU LAMAIRE, M. **Traité d'helminthologie Médicale et Veterinaire.** Paris : Vigot Frères, 1936. 1436 p.

OLDHAM, G. Antibodies to *Fasciola hepatica* antigens during experimental infections in cattle measured by elisa. Amsterdam, **Vet. Parasitol., Amsterdam**, n. 13, p. 151-158, 1983.

O'NEIL, S.; PARKINSON, M.; STRAUSS, W.; ANGLES, R.; DALTON, J. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infections (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsine L cysteine proteinase. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, n. 58, p. 417-423, 1998.

O'NEIL, S.; PARKINSON, M.; DOWD, A.; STRAUSS, W.; ANGLES, R.; DALTON, J. Immunodiagnosis of human fasciolosis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsine L-1 cysteine proteinase. (Abstract). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v. 60, n. 5, p. 749-751, 1999.

PELAYO, L.; ESPINO, A.; DUMENIGO, B.; FINLAY, C. Detección de anticuerpos, antígenos y complejos inmunes circulantes em la fasciolosis aguda y crônica. Resultados preliminares. Cuba, **Rev.Cuba. Med. Trop.**, Habana, n. 50, n. 3, p. 209-214, 1998.

PIEKARSKI, G. **Tratado de Parasitologia.** Madrid : Aguilar, 1959. 831 p.

Edwin PILE¹; José Augusto Albuquerque dos SANTOS¹; Tatiana PASTORELLO¹; Maurício VASCONCELLOS¹

PILE, E.; SANTOS, J. A. A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELLOS, M. *Fasciola hepatica* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.38, n.1, p.42-43, 2001.

QUEIROZ, V. S. **Estudo da *Fasciola hepatica* LINNAEUS, 1758 (Trematoda Fasciolidae) nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná, no Estado do Paraná – Brasil.** Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

QUEIROZ, V. S.; LUZ, E.; LEITE, L. C. CÍRIO, S. M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). **Acta Biol. Parana.**, Curitiba, v. 31, n. 1-4, p. 99-111, 2002.

REZENDE, H. E. B.; ARAÚJO, J. L. B.; GOMES, P. A. C. et al. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea Lamark*, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* L. no Estado do Rio de Janeiro. (*Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae*). Rio de Janeiro, **Arq. Univ. Fed. Rural. Rio J.**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 21-23, 1973.

RODRÍGUEZ-OSORIO M., ROJAS, J.; GÓMEZ-GARCÍA, V. *Fasciola hepatica*: partial characterization of circulating antigens. **J. Parasitol.**, Lawrence, n. 94, p. 1053-1055, 1998.

RODRÍGUEZ-PEREZ, J.; HILLYER, G. Detection of excretory-secretory circulating antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *F. hepatica*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, n. 56, p. 57-66, 1995.

ROJAS, M. **Parasitismo de los animales domésticos.** Peru : Maijosa, 1990. 121p.

SAMPAIO-SILVA, M. L.; Da COSTA, J. M.; Da COSTA, A. M.; PIRES, M. A.; LOPES, S. A.; CASTRO, A. M. Antigenic component of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infectos. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, n. 54, p. 146-148, 1996.

SERRA-FREIRE, N.M.; BORDIN, E.L.; LESSA, C.S.S. et al. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **Hora Vet.**, Porto Alegre, n. 1, p. 19-21, jul. 1995.

SHAKER, Za.; DEMERDASH, Za.; MANSOUR, Wa.; HASSANEIN, Hi.; EL MOHANDES, M.; EL GINDY, Hi. Purification and characterization of a specific *Fasciola* antigen. (Abstract). **J. Egypt Soc. Parasitol.**, Cairo, n. 24, p. 309-316, 1994a.

SHAKER, Za.; DEMERDASH, Za.; MANSOUR, Wa.; HASSANEIN, Hi.; EL BAZ, Hg.; EL GINDY, Hi. Evaluation of specific *Fasciola* antigen in the immunodiagnosis of human fasciolosis in Egypt. (Abstract). **J. Egypt Soc. Parasitol.**, Cairo, n. 24, p. 463-470, 1994b.

SILVA, M. A.; URARTE, E.; MERCADO, R.; GORMAN, T. Aplicación de inmunoelctrotransferencia empleando antígenos de excreción-secreción em el diagnóstico de la fasciolosis humana. **Parasitol. Dia**, Santiago, n. 17, p. 144-146, 1993.

SMOOKER, P. A single amino acid substitution affect substrate specificity in cysteine proteinase from *Fasciola hepatica*. (Abstract). **Protein Sci.**, Cold Spring Harbor, n. 9, p. 2567-2572, 2000.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia y enfermedades parasitarias**. 7.ed. México : Interamericana, 1987. 77 p.

SUAZO, F. M., HERNANDEZ, E. F., SORIANO, G. F. Estudio epizootiologico de la fascioliasis en la zona centro del Estado de Guerrero. **Téc. Pecu. Méx.**, Mexico, v. 27, n.1, p. 41-47, 1989.

TELLO, P.; SALINAS, P.; LOGUEIRO, S.; OBON, A.; OJEDA, M. Evaluación de una técnica de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico serológico de la fasciolosis humana. **Bol. Chil. Parasitol.**, Santiago, n. 44, p. 25-27, 1988.

TENDLER, M.; KATZ, N.; SIMPSON, A. J. Vaccine against helminth infection comprising Sm-14 fatty acid binding protein of *Schistosoma mansoni*. **United States Patent**, v. 5, p.730-984, mar. 24, 1998.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 2. ed. Porto Alegre : Ed. UFRGS, 1988.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Barcelona : Acribia , 2001. 129p.

VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 7.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1985. 1209p.

YAMASAKI, H.; AOKI, T., OYA, H. A cystein proteinase from the liver fluke *Fasciola* spp. Purification, characterization, localization and application to immunodiagnosis. Japão, **J. Parasitol.**, Lawrence, n. 38, p. 373-384, 1989.

ZUBIETA, R. C. Utilizacion de coproantigenos y coproanticuerpos en helmintologia. Disponível em: <http://www.inta.gov.ar/producto/helminto/conf_raquel.htm> Acesso em : 26 ago.2003.

ZULANTAY, I.; AGUILERA, X.; APT, W.; VARGAS, F.; RODRÍGUES, J. Ensayo inmunoenzimatico ELISA IgG aplicado al diagnóstico de la fasciolosis hepática humana crônica. **Parasitol. Dia**, Santiago, n. 16, p. 29-34, 1992.

APÊNDICES

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – MATERIAIS	82
APÊNDICE B – PREPARO DO ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE <i>Fasciola hepatica</i> FhSE	97
APÊNDICE C – PREPARO DOS ANTICORPOS ANTI FHSE.....	85
APÊNDICE D – PRODUÇÃO DE ANTÍGENO TOTAL DE <i>Euritrema coelomaticum</i>	87
APÊNDICE E – SOLUÇÕES PARA A TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING	88
APÊNDICE F – TÉCNICA DOS QUATRO TAMIZES MODIFICADA.....	91
APÊNDICE G – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICE H – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A VERIFICAÇÃO DA CONCEN- TRAÇÃO PROTEÍCA DO ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE <i>Fasciola hepatica</i> , PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976)	93
APÊNDICE I – DETERMINAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DO PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS – FIG. 11.....	94
APÊNDICE J – DETERMINAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DO PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS – FIG. 7.....	95
APÊNDICE K – PEPTÍDEOS DE <i>Fasciola hepatica</i> , POR PESO MOLECULAR, AUTORES E ANO DE ESTUDO	96

APÊNDICE A

LISTA DE EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REATIVOS

Bastão de Vidro
Becker de 100 ml
Becker de 250 ml
Banho-Maria modelo 100
Centrífuga Bekman J-21B
Centrigugador EXCELSA 2
Erlenmayer de 250 ml
Estante para tubos de ensaio
Estufa Fanem com temperatura ajustável
Freezer INDREL CPH 35
Lâminas de vidro para microscopia
Luvas cirúrgicas
Multipipetador
Pinças em aço inox
Pipetas automáticas capacidade: 20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl, 5000 µl.
Pipetas graduadas capacidade 1, 2, 3, 5 e 10 mL
Placas hemobag de 96 “weels”
Placas de Petri
Ponteiras descartáveis para micropipeta
Provetas de vidro graduadas capacidade 10, 500 e 1000 mL
Tesouras em inox
Tubos de centrífuga em polipropileno.

REATIVOS

Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)

Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)

Caseína

Carbonato de sódio (Na_2CO_3)

Bicarbonato de Sódio ($Na H CO_3$)

Fosfato de Sódio Dibásico (Na_2HPO_4)

Cloreto de Sódio ($NaCl$)

Hidróxido de Sódio ($NaOH$)

Orto-fenileno-diamino (OPD)

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Tween 20

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

Ácido dietilaminotetracético (EDTA)

APÊNDICE B

PREPARO DO ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE *Fasciola hepatica* FhSE

Os antígenos de secreção/excreção de *F. hepatica* (FhSE) são preparados como segue. Vermes adultos vivos e intactos obtidos de fígados de bubalinos de um frigorífico local são lavados com tampão fosfato (PBS), pH 7,2, para remover todos os traços de sangue e bile. Os vermes são, então, incubados por 3 h em PBS contendo 1 mM de fenilmetil sulfonil fluoride (PMSF) à 37°C. O meio é coletado, concentrado 20 vezes por diálise em polietileno glycol peso molecular 15 000 e centrifugado a 20 000g por 20 minutos a 4°C. Após a dosagem da proteína (BRADFORD,1976), o sobrenadante é estocado em alíquotas a -70°C até o uso (HILLYER, 1993).

A modificação do método deu-se da seguinte maneira:

Foram utilizadas 40 espécimes de *Fasciola hepatica* em 150 ml de PBS pH 7,2 + EDTA 0,01 M + penicilina, incubadas a 37°C durante 3 h.

O meio após o cultivo foi concentrado em polietilenoglicol para 19 ml, utilizando-se tubo de diálise de membrana de celulose (Sigma D-9777), retenção de 12.000 Da. Foram colocados 32,5 ml na membrana, que foi amarrada em ambas as extremidades e colocadas escamas puras de polietilenoglicol por cima, à medida que ia saindo o líquido, foi-se adicionando mais meio de cultivo e colocando mais escamas por fora. Este processo foi feito em temperatura de 4°C.

Foram adicionados 19 µl de PMSF 0,2 M.

Centrifugado a 10.000 g por 60 minutos.

O sobrenadante foi então dividido em alíquotas de 2 ml, em frascos de Eppendorf e armazenado a -20°C até o uso.

APÊNDICE C

PREPARO DOS ANTICORPOS ANTI FhSE

Soros policlonais anti-FhSE foram obtidos em coelhos Nova Zelândia Brancos hiperimunizados subcutaneamente com FhES. A imunização inicial (100 µg FhES) em adjuvante completo de Freund [em volume igual ao do antígeno era injetado via subcutânea] e as imunizações subseqüentes com adjuvante incompleto de Freund, [a cada 15 dias era feita uma sangria de prova +- 10 ml na veia marginal da orelha do coelho e imunizado o mesmo, após 15 dias da terceira imunização foi realizada uma sangria de produção de 50 ml por punção cardíaca. O sangue deixado em banho-maria a 37°C por cerca de 2 h após a coleta e então centrifugado sendo o soro coletado e armazenado a -20°C até o uso].

Após a mensuração das proteínas, as imunoglobulinas de coelho são armazenadas a -20°C até o uso.

Solução Tampão (PBS) pH 7,2

SAIS	MOLARIDADE	QUANTIDADE (g)
Cloreto de Sódio NaCl	0,15M	8,77
Fosfato de Sódio Anidro Na ₂ HPO ₄	0,0072M	1,02
Fosfato de Sódio monobásico Anidro NaH ₂ PO ₄	0,0028M	0,34
Água destilada H ₂ O	Qsp	1.000 MI
EDTA C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	0,01M	3,26g

Os sais descritos acima, quando não utilizados na forma anidra, deverão ter suas quantidades recalculadas em função das moléculas de água presentes. Verifique sempre no rótulo dos produtos a composição dos sais e o peso

molecular.

Exemplo de correção de peso para preparo de PBS quando se utiliza o fosfato dibásico hidratada com 12 moléculas de água.

Cálculo: Na_2HPO_4 - peso molecular: 142 - pesar 1,02 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - peso molecular: 359 - pesar X g

142----- 1,02

358----- X

X: 2,57 g

Neste exemplo, onde o Fosfato Dibásico é hidratado com 12 moléculas de água, deve-se pesar 2,57 g para preparar o PBS.

Obs: se necessário, corrigir o pH com HCl ou NaOH.

PBS pH 7,2 para 2 litros

NaCl: 17,54 g

Na_2HPO_4 : 2,04 g

NaH_2PO_4 : 0,68 g

EDTA: 6,52 g

Preparo do PMSF

Phenylmethylsulfonyl fluoride

- PMSF (Sigma P-7626) – 200 mM ou 0,2 M (0,035g em 1 ml de methanol)

Uso: acrescentar ao meio de cultivo PMSF 0,2 M (5 $\mu\text{l}/\text{mL}$ de meio coletado). PM do PMSF: 174,2 g/ mol.

Concentração final de PMSF no meio: 1 mM.

FONTE: Toxocaríase: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e UEPG, PR.

APÊNDICE D

PRODUÇÃO DE ANTÍGENO TOTAL DE *EURITREMA COELOMATICUM*

O antígeno foi produzido a partir de parasitas, obtidos de pâncreas de bubalinos infectados abatidos em frigorífico. Os pâncreas parasitados foram cortados e os parasitos recolhidos com pinça anatômica. A seguir os mesmos foram lavados 10 vezes em soro fisiológico. Posteriormente os parasitos foram armazenados em congelador à temperatura de -20°C até a manipulação para a produção do antígeno.

Após o descongelamento, os parasitos foram homogenizados em homogeneizador de tecidos, aumentando a rotação até 700 rpm, por 3 minutos, em banho de gelo.

O material foi submetido ao ultra-som (20 kHz, 1 mA) durante 30 segundos, com intervalo de 30 segundos, por 4 vezes (em banho de gelo)

Foi garantida a isotonia da mistura empregando-se NaCl 0,3 molar em volume igual ao do material obtido anteriormente.

Novamente submeteu-se o material ao ultra-som nas mesmas condições acima descritas.

Ao extrato antigênico foram adicionados inibidores de proteases phenylmethyl-sulfoyl fluoride (PMSF) na concentração final de 1 mM e ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) na concentração final de 2 mM.

Deixou-se o material sob leve agitação, com barra magnética, por 18 horas, a 4°C .

Centrifugou-se a 7.000 g, por 60 minutos, a 4°C .

O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado a 16.000g, por 60 minutos, a 4°C , sendo recolhido o sobrenadante e descartado o sedimento.

Procedeu-se à dosagem de proteína pelo método BRADFORD (1976).

A solução antigênica foi distribuída em alíquotas de 1 mL, congeladas a -20°C , sendo armazenadas nesta temperatura até o uso.

APÊNDICE E

SOLUÇÕES PARA A TÉCNICA *WESTERN BLOTTING*

Tampão de corrida – TRIS HCl pH 8,3:

- 3,0 g de TRIS.
- 14,4 g de glicina.
- 1,0 g de SDS (dodecil sulfato de sódio)
- Ajustar o pH com HCl a 50% e completar o volume até 1000 ml com água destilada. A solução é estável a 4°C (Utiliza-se um litro por corrida. Esta solução pode ser filtrada e reutilizada)

Tampão de Amostra:

- 2,5 ml de solução D
- 5,0 ml de solução C
- 2,0 ml de glicerol
- 0,1 ml de EDTA 0,1M
- 0,2 mg de azul de bromofenol (indicador de corrida).
- Para eletroforese em condição redutora, no momento do uso adicionar 5 µl de 2-mercaptoetanol para cada 195 µl de tampão de amostra. O 2-mercaptoetanol rompe as pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas.
- Completar o volume para 20 ml.

Deve ser preparado no momento do uso.

Soluções para preparo do gel

Solução A

- 30 g de acrilamida (usar luvas e máscara – produto neurotóxico)
- 0,8 g de bis-acrilamida.
- Completar o volume para 100 ml com água destilada. Homogeneizar muito bem (usar agitador magnético). Filtrar a solução, armazenar em frasco âmbar a temperatura de 4°C.

Solução B (tampão do gel de corrida)

- 18,15 g de TRIS.
- Diluir em água destilada.
- Ajustar o pH para 8,8 com HCl 50% e completar o volume para 100 ml com água destilada. A solução é estável por duas semanas se for armazenada à temperatura de 4°C.

Solução C (SDS 10%)

- 5 g de SDS
- Completar o volume para 50 ml com água destilada. É **estável em temperatura ambiente**. Em baixas temperaturas a solução pode precipitar, neste caso pode-se aquecer a 25 °C.

Solução D (tampão do gel de empilhamento)

- 3,0 g de TRIS
- Ajustar o pH para 6,8 com HCl e completar o volume para 59 ml com água destilada. A solução é **estável por duas semanas se armazenada à temperatura de 4 °C**.

Persulfato de Amônio 10%

- 0,5 g de Persulfato de amônio (NH₄)₂S₂O₈
- Água destilada qsp. 5 ml.
- **Preparar no dia do uso ou conservar a -20 °C em alíquotas que serão descartadas após o uso.**

SOLUÇÃO CORANTE PARA PROTEÍNAS A SEREM REVELADAS POR WESTERN BLOTTING**Coloração pelo Coomassie Brilhante**

Deixar o gel submerso no corante durante 20 a 30 minutos e após deixá-lo em solução descorante até as bandas proteicas ficarem bem nítidas.

Solução corante

- 0,25% massa/volume Coomassie Brilhante R 250,
- 50 ml de metanol,
- 10 ml de ácido acético,
- Completar o volume para 100ml com água destilada,
Acondicionar em frasco âmbar.

Solução descorante

- 50 ml de metano,
- 50 ml de água destilada
Acondicionar em frasco âmbar.

Corante de Ponceau

- Ponceau 0,2% massa/volume em solução de ácido acético 3%.
- Cora proteínas fixadas em membrana de nitrocelulose com sensibilidade de 1 µg por banda.

O corante é hidrossolúvel podendo ser removido por água destilada ou PBS.

APÊNDICE F

TÉCNICA DOS QUATRO TAMIZES MODIFICADA

Esta técnica consiste em diluir duas gramas de fezes homogeneizadas, em 100 ml de água contendo cinco gotas de detergente, a seguir esta mistura é vertida sobre o conjunto de cinco tamizes, o primeiro de malhas de nylon com malhas semelhantes às de uma peneira comum, para reter fibras e grandes partículas das fezes, e os demais em número crescente de malhas por polegada quadrada, na seguinte ordem: 120, 180, 200 e 250 malhas por polegada quadrada.

Realiza-se então a lavagem dos tamizes, vertendo água de torneira na parte superior do conjunto, cerca de 50 ml de cada vez, por cinco vezes. É necessário que após cada adição de água, os tamizes superiores sejam ligeiramente afastados dos inferiores e abaixados novamente de forma que a parte inferior daqueles fique em contato com parte superior destes várias vezes para assegurar o escoamento do líquido.

Após escoada a água da última lavagem, colocam-se os tamizes de 200 e 250 malhas por polegada, um de cada vez, sobre um cálice de sedimentação em posição invertida, passando cerca de 50 ml de água da torneira sob pressão, pelo mesmo, para remover os ovos que ficaram retidos nas malhas para o cálice.

Deixa-se sedimentar por meia hora.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, coleta-se 0,5ml do líquido do fundo do cálice e coloca-se sobre lâmina de microscopia, recobre-se com uma lamínula e lê-se ao microscópio óptico em aumentos de 50X e 100X, à procura de ovos do parasita.

Deve-se realizar a leitura de cinco lâminas de cada amostra para se ter certeza do resultado.

APÊNDICE G
CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Cromatógrafo HPLC marca Agilent

Coluna: ZORBAX GF-250, 9,4 mm ID x 25 cm (4-4,5 µm)

Fase Móvel: 130 mM Na Cl/20 mM Na₂HPO₄, pH 7,0

Fluxo: 1,0 mL/min

Temperatura: 23°C

Detector: UV (210 nm)

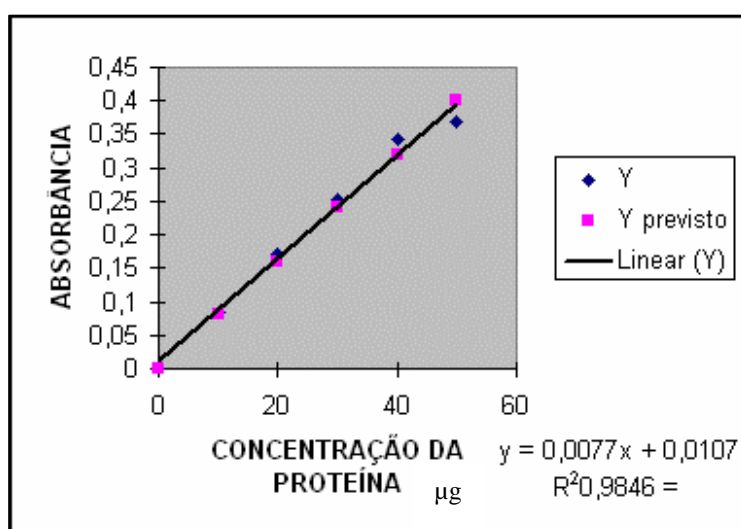
APÊNDICE H

CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO ANTÍGENO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE *FASCIOLA* HEPÁTICA, PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976)

0	0
10	0,084
20	0,172
30	0,253
40	0,342
50	0,368

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,991248
R-Quadrado	0,982572
R-quadrado ajustado	0,782572
Erro padrão	0,019165
Observações	6



ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,10354	0,10354	81,8887	7,38E-05
Resíduo	5	0,001837	0,000367		
Total	6	0,105377			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Variável X 1	0,007	0,000258	0,92158	6,64E-07	0,007327	0,008655	0,007327	0,008655

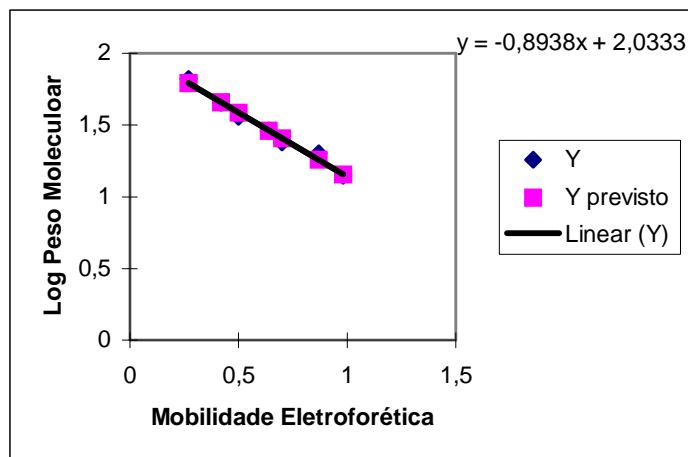
RESULTADOS DE RESÍDUOS

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>
1	0	0
2	,079909	,004091
3	0,159818	,012182
4	0,239727	,013273
5	0,319636	0,022364
6	0,399545	-0,03155

APÊNDICE I

DETERM. DA RETA PARA CÁLCULO DO PM DAS PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS - Fig. 11

1,8195	0,27
1,6532	0,42
1,5563	0,5
1,4624	0,64
1,3802	0,7
1,301	0,87
1,1461	0,98



RESUMO DOS RESULTADOS

Estadística de regressão

R múltiplo	0,992389
R-Quadrado	0,984835
R-quadrado ajustado	0,981802
rro padrão	0,030397
Observações	7

ANOVA

	<i>L</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão		0,300017	0,300017	324,707	9,67E-06
Resíduo		0,00462	0,000924		
Total		0,304637			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2,033346	0,033094	61,44222	2,16E-08	1,948276	2,118415	1,948276	2,118415
Variável X 1	-0,89377	0,0496	-18,0196	9,67E-06	-1,02127	-0,76627	-1,02127	-0,76627

RESULTADOS DE RESÍDUOS

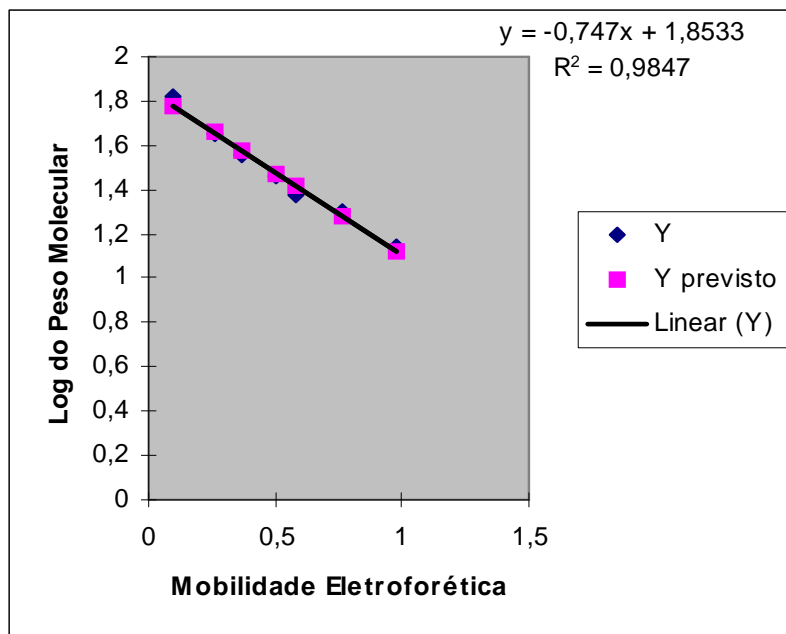
<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>	<i>Percentil</i>	
1	1,792027	0,027473	0,99007	7,142857	1,1461
2	1,657962	-0,00476	-0,1716	21,42857	1,301
3	1,58646	-0,03016	-1,08691	35,71429	1,3802
4	1,461332	0,001068	0,038495	50	1,4624
5	1,407706	-0,02751	-0,99125	64,28571	1,5563
6	1,255764	0,045236	1,630211	78,57143	1,6532
7	1,15745	-0,01135	-0,40902	92,85714	1,8195

RESULTADOS DE PROBABILIDADE

APÊNDICE J

DETERM. DA RETA PARA CÁLCULO DO PM DAS PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS - Fig. 7

Peso molecular	Log do peso molecular
66	1,8195
45	1,6532
36	1,5563
29	1,4624
24	1,3802
20	1,301
14	1,1461



RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão

R múltiplo	0,992342
Rquadrado	0,984742
R-quadrado ajustado	0,98169
Erro padrão	0,03049
Observações	7

ANOVA

	GI	SQ	MQ		F de significação
Regressão		0,299988	0,299988	322,6927	9,82E-06
Resíduo		0,004648	0,0009		
Total		0,304637			

Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	1,853346	0,024052	77,0546	6,97E-09	1,791518	1,915175	1,791518
Variável X 1	-0,74697	0,041582	-17,9636	9,82E-06	-0,85386	-0,64008	-0,85386

RESULTADOS DE RESÍDUOS

Observação	Y previsto	Resíduos	Resíduos padrão	Percentil
1	1,779396	0,040104	1,440844	7,142857
2	1,659882	-0,00668	-0,24005	21,42857
3	1,576968	-0,02067	-0,74256	35,71429
4	1,475381	-0,01298	-0,46636	50
5	1,420105	-0,0399	-1,4337	64,28571
6	1,281916	0,019084	0,685653	78,57143

RESULTADOS DE PROBABILIDADE

Observação	Y previsto	Resíduos	Resíduos padrão	Percentil
1	1,779396	0,040104	1,440844	7,142857
2	1,659882	-0,00668	-0,24005	21,42857
3	1,576968	-0,02067	-0,74256	35,71429
4	1,475381	-0,01298	-0,46636	50
5	1,420105	-0,0399	-1,4337	64,28571
6	1,281916	0,019084	0,685653	78,57143

APÊNDICE K

PEPTÍDEOS DE *FASCIOLA HEPATICA*, POR PESO MOLECULAR, AUTORES E ANO DE ESTUDO

AUTOR/ANO	PESO MOLECULAR DOS POLIPEPTÍDEOS (kDa)				
FREDES <i>et al.</i> (2001)	14	29			
ABDEL RAHMAN <i>et al.</i> (1999)		26-28			
DÍAZ <i>et al.</i> (1998)	11-13 14-16	23-33	55-57	65-71	86-136
ESPINO <i>et al.</i> (2000)	11-14-17- 19-20	23-24-25- 26-32	46-47-51	62-66	
HAMMAMI <i>et al.</i> (1997)	9-12	29	57		
CÓRDOVA <i>et al.</i> (1997)		25-26			
SAMPAIO-SILVA <i>et al.</i> (1996)	12-16-19	25-27			
SHAKER <i>et al.</i> (1994)	12	33	54		
SILVA <i>et al.</i> (1994)	16	26-30-33- 38-40	49-50	75-84	96-109
HILLYER <i>et al.</i> (1992)	12-17			63	
YAMASAKI <i>et al.</i> (1989).		27			
MERCADO (1989)	14			66	94-96
HILLYER e SOLER (1988)	17			63	
QUEIROZ (2005)	13-16	26	55-60	66-71-74- 76-79	