

RUBENS LUIZ FERREIRA GUSSO

ESTUDO COMPARATIVO DOS ANTÍGENOS DE
Cysticercus longicollis* e *Cysticercus cellulosae
NO IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE
HUMANA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:

Prof.^ª Dr.^ª Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador:

Prof. Dr. Sérgio Monteiro de Almeida

CURITIBA

2000



PARECER


A Comissão Examinadora da Defesa de Tese do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária RUBENS LUIZ FERREIRA GUSSO após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

1) A Tese, intitulada "ESTUDO COMPARATIVO DOS ANTÍGENOS DE *Cysticercus longicollis* e *Cysticercus cellulosae* NO IMUNODIAGNOSTICO DA NEUROCISTICERCOSE" foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.

2) O Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, atribuiu o conceito "A" concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 12 de dezembro de 2000.


 Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL
 Presidente/Orientador


 Prof. Dr. AFFONSO ANTONIUUK
 Membro


 Prof. Dr. SÉRGIO MONTEIRO DE ALMEIDA
 Membro

DEDICATÓRIA

A DEUS.

Aos meus pais Rubens e Marcília que dedicaram suas vidas à família, e aos meus irmãos Márcio, Décio, Cláudio e Orlandoni que são exemplos de união e amizade.

À minha esposa Sônia que teve a grandeza de entender a importância deste trabalho e aos meus filhos Filipe e Giovani alegrias de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr.^ª Vanete Thomaz Soccol pelo respeito, amizade, ensinamentos e paciência ao longo de toda a jornada.

Ao Prof. Dr. Sérgio Monteiro Almeida pela orientação e compreensão.

Ao amigo de todas as horas, Prof. Natal Jataí de Camargo pela generosidade em compartilhar toda sua experiência profissional.

Aos diretores do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos: Sandra Regina Ruiz Sella, Isolete Pauli Silva e Rubens Gomes de Souza, à farmacêutica Takako Miyawaki, à bióloga Maria Inês de Pizzol Corrêa, ao médico veterinário João Carlos Minozzo e demais colegas de trabalho.

À direção e funcionários do Laboratório Central do Estado, em especial à farmacêutica Soraia Reda Gilber, ao médico veterinário Oscar Lago Pessoa, às técnicas de laboratório Divandreia Martins Matoski e Maria Lemes da Rocha.

À direção e funcionários do Hospital de Clínicas, especialmente aos farmacêuticos Karin Braun, Edna Yoshiko Nakanishi e Luis Antonio Wanbier Fialla, à Luznea Buchmann, ao Edson Luis Farias e à Marilone Vargas (Serviço de Análises Clínicas) e do Serviço de Neurologia.

Aos diretores do Centro de Saúde Ambiental: Isaias Cantoia, Gisélia Guimarães Rúbio, Sandra Regina Scorsato Garcia. À bibliotecária Márcia Lopes Siqueira e à Jean Rosa Lernerneier da Biblioteca, ao fotógrafo Venilton Kuchler do Grupo de Comunicação Social, à Josina Nunes, ao Marcelo Lasperg de Andrade e à direção do Departamento Técnico de Informática da Secretaria da Saúde do Paraná.

À direção e funcionários do Setor de Ciências Biológicas (Laboratório de Parasitologia Veterinária) e do Setor de Ciências Agrárias (Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) da Universidade Federal do Paraná.

À direção e funcionários do Centro de Epidemiologia da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba. À estatística Angela Mata Martins pela especial contribuição analítica. À Prof^ª. Dr.^ª Adelaide José Vaz pelo apoio dispensado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 HISTÓRICO	6
2.2 O PARASITO: <i>TAENIA SOLIUM</i>	7
2.2.1. Posição Sistemática.....	7
2.2.2. Morfologia	7
2.2.3. Ciclo Biológico.....	9
2.3 ASPECTOS PATOLÓGICOS DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA .	10
2.4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO COMPLEXO TENIOSE E CISTICERCOSE	11
2.4.1. Cisticercose Animal.....	11
2.4.2. Teniose e o Meio Ambiente.....	12
2.4.3. Cisticercose Humana	13
2.5. DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA	18
2.5.1. Técnicas não Invasivas por Imagem.....	19
2.5.2. Técnicas Imunológicas.....	19
2.5.3. Produção de Antígenos para Provas de Imunodiagnóstico Humano.....	20
3. OBJETIVOS	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 CASUÍSTICA.....	24
4.1.1. Obtenção das Amostras de Líquido Cefalorraquiano.....	24
4.1.2. Grupo de Estudo	25
4.1.3. Grupo Controle.....	26
4.1.4. Caracterização de Grupos	27
4.2. MÉTODO.....	28
4.2.1. Componentes Biológicos para Preparação de Antígenos.....	28
4.2.2. Produção de Antígenos para Imunodiagnóstico da Neurocisticercose Humana	30
4.2.3. Pesquisa de Anticorpos anti- <i>Cysticercus cellulosae</i> no Líquido Cefalorraquiano	33
4.3 MÉTODO ESTATÍSTICO.....	44
4.3.1. Matriz para Cálculo de Indicadores de Sensibilidade e Especificidade	44

5. RESULTADOS	45
5.1. RENDIMENTOS DA PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS.....	45
5.2. PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS.....	45
5.3. RESULTADO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO COM ANTÍGENO HOMÓLOGO E HETERÓLOGO NOS PACIENTES COM DIAGNÓSTICO PROVÁVEL DE NEUROCISTICERCOSE	47
5.3.1. Grupo de Estudo.....	47
5.3.2. Grupo Controle.....	52
5.4. ESTUDO DOS INDICADORES DOS TESTES IMUNOLÓGICOS COM AMOSTRAS COM DIAGNÓSTICO PROVÁVEL	53
5.4.1. Teste de Imunofluorescência Indireta	53
5.4.2. Teste Imunoenzimático	54
5.5. ANÁLISE DA EFICÁCIA DOS TESTES IMUNOLÓGICOS COM AMOSTRAS COM DIAGNÓSTICO PROVÁVEL	57
5.6 EFICÁCIA DAS REAÇÕES IMUNOLÓGICAS UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO EM UMA POPULAÇÃO COM DIAGNÓSTICO DEFINITIVO DE NEUROCISTICERCOSE	59
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO	69
GLOSSÁRIO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO 1	81
PROPOSTA PARA CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DA CISTICERCOSE HUMANA E NEUROCISTICERCOSE - PROPOSAL OF DIAGNOSTIC CRITERIA FOR HUMAN CYSTICERCOSIS AND NEUROCYSTICERCOSIS (DEL BRUTO, 1996).	81
ANEXO 2.....	84
REAGENTES, VIDRARIA, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS COMPLEMENTARES PARA CONFECÇÃO DOS ANTÍGENOS DE <i>CYSTICERCUS CELLULOSAE</i> E <i>CYSTICERCUS LONGICOLLIS</i>	84
ANEXO 3	86
REAGENTES, VIDRARIA, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS COMPLEMENTARES UTILIZADOS NA REALIZAÇÃO DAS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO.....	86
ANEXO 4.....	89
RESULTADOS ESTATÍSTICOS	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DO SEXO DOS PACIENTES COM CISTOS EM ATIVIDADE E CALCIFICAÇÕES. CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000	27
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO SEXO DOS PACIENTES COM CISTO E DO GRUPO CONTROLE , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	27
TABELA 3 – RESULTADO DO TESTE IFI UTILIZANDO OS ANTÍGENOS <i>Cysticercus cellulosae</i> e <i>Cysticercus longicollis</i> DOS PACIENTES COM CISTO, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	49
TABELA 4 - RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO, EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CISTOS EM ATIVIDADE NO ENCÉFALO, UTILIZANDO ANTÍGENOS <i>Cysticercus cellulosae</i> E <i>Cysticercus longicollis</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	50
TABELA 5 - RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO, EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CALCIFICAÇÕES NO ENCÉFALO, UTILIZANDO ANTÍGENOS <i>Cysticercus cellulosae</i> E <i>Cysticercus longicollis</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.....	50
TABELA 6 - RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO, EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CISTOS VIVOS, DEGENERADOS E CALCIFICAÇÕES NO ENCÉFALO, UTILIZANDO ANTÍGENOS <i>Cysticercus cellulosae</i> E <i>Cysticercus longicollis</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.....	51
TABELA 7 - RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E IMUNOENZIMÁTICO EM 51 AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES DO GRUPO CONTROLE, UTILIZANDO EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE <i>Cysticercus cellulosae</i> E <i>Cysticercus longicollis</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	53
TABELA 8 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALORES PREDITIVOS, ÍNDICE DE YODEN, CONCORDÂNCIA E DISCORDÂNCIA DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA APLICADOS A AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES PORTADORES DE CISTOS COM ATIVIDADE, CALCIFICAÇÕES E TOTAL, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.....	54
TABELA 9 - NÚMERO E PERCENTUAL DE PACIENTES TESTADOS PELO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO, GRUPO DE ESTUDO E GRUPO CONTROLE, COM ANTÍGENOS DE <i>Cysticercus cellulosae</i> e <i>Cysticercus longicollis</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.....	55
TABELA 10 - REAGENTES E NÃO REAGENTES, DOS GRUPOS DE ESTUDO E CONTROLE, NO TESTE IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO ANTÍGENO DE <i>Cysticercus cellulosae</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	55
TABELA 11 - REAGENTES E NÃO REAGENTES, DOS GRUPOS DE ESTUDO E CONTROLE, NO TESTE IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO ANTÍGENO DE <i>Cysticercus longicollis</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	56
TABELA 12 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALORES PREDITIVOS POSITIVO E NEGATIVO, ÍNDICE DE YODEN, CONCORDÂNCIA E DISCORDÂNCIA DOS TESTES DE IMUNOENZIMÁTICOS APLICADOS A AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CISTOS EM ATIVIDADE, CALCIFICAÇÕES E TOTAL , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.....	56
TABELA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE AS SENSIBILIDADES, ESTIMADAS E REAIS, DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E IMUNOENZIMÁTICOS APLICADOS A AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CISTOS EM ATIVIDADE, CALCIFICAÇÕES E TOTAL, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.....	58
TABELA 14 – EFICÁCIA DAS REAÇÕES IMUNOLÓGICAS UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO EM UMA POPULAÇÃO COM DIAGNÓSTICO DEFINITIVO DE NEUROCISTICERCOSE, CURITIBA – PARANÁ - 2000	60
TABELA 15 - RESULTADOS OBTIDOS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E TESTE IMUNOENZIMÁTICO EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE 21 INDIVÍDUOS COM CISTOS EM ATIVIDADE, UTILIZANDO ANTÍGENOS <i>Cysticercus cellulosae</i> E <i>Cysticercus longicollis</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	90
TABELA 16-RESULTADOS OBTIDOS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE 18 INDIVÍDUOS COM CALCIFICAÇÕES NO ENCÉFALO. PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Cysticercus cellulosae</i> , UTILIZANDO EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE <i>Cysticercus cellulosae</i> E <i>Cysticercus longicollis</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	90
TABELA 17 - NÚMERO DE AMOSTRAS SELECIONADAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES DO GRUPO CONTROLE, POR DIAGNÓSTICO, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.....	91

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA IDADE DOS PACIENTES COM CISTO E DO GRUPO CONTROLE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	28
QUADRO 2 - DILUIÇÕES DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO EM PBS PARA TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	34
QUADRO 3 – DILUIÇÕES DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO EM PBS PARA TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	39
QUADRO 4 - DILUIÇÕES DO CONJUGADO ANTI-IgG HUMANA EM TWEEN A 2%, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000. PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	39
QUADRO 5 - DILUIÇÃO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO PARA TITULAÇÃO DO CONJUGADO ANTI-IgG HUMANA, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.....	40
QUADRO 6 - ESQUEMA COM ORIFÍCIOS DA MICROPLACA PARA TESTE IMUNOENZIMÁTICO INDICANDO OS PONTOS DE COLOCAÇÃO DOS CONTROLES NEGATIVOS E BRANCOS DA REAÇÃO, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	41
QUADRO 7 – RESULTADOS DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO APLICADOS NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE INDIVÍDUOS COM NEUROCISTICERCOSE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	48
QUADRO 8 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO TESTE ELISA UTILIZANDO OS ANTÍGENOS <i>Cysticercus cellulosae</i> e <i>Cysticercus longicollis</i> DOS PACIENTES COM CISTO E DO GRUPO CONTROLE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	52
QUADRO 9 - NÚMERO DE REGISTRO, INICIAIS DO NOME, MUNICÍPIO, IDADE, SEXO E RESULTADOS DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO APLICADOS A 21 AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE INDIVÍDUOS COM NEUROCISTICERCOSE, PORTADORES DE CISTOS EM ATIVIDADE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	92
QUADRO 10 - NÚMERO DE REGISTRO, INICIAIS DO NOME, MUNICÍPIO, IDADE, SEXO E RESULTADOS DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO APLICADOS A 18 AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE INDIVÍDUOS COM NEUROCISTICERCOSE, PORTADORES DE CALCIFICAÇÕES, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	93
QUADRO 11 - NÚMERO DE REGISTRO, INICIAIS DO NOME, MUNICÍPIO, IDADE, SEXO, DIAGNÓSTICO, RESULTADOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO APLICADOS ÀS 51 AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	94
QUADRO 12-RESULTADOS OBTIDOS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, ENZIMOIMUNOENSAIO EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE 51 PACIENTES DO GRUPO CONTROLE. PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Cysticercus cellulosae</i> , UTILIZANDO EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE <i>Cysticercus cellulosae</i> E <i>Cysticercus longicollis</i> , CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.	96

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA 1. Secção de um cérebro humano com grande quantidade de cisticercos intraparenquimatosos. Foto cedida pelo Prof. Dr. Affonso Antoniuk.</u>	1
<u>FIGURA 2. Imagem de tomografia axial computadorizada de um cérebro humano com múltiplos cisticercos. Fonte: Hospital Nossa Senhora das Graças.</u>	2
<u>FIGURA 3. Imagem de escólex de <i>Taenia saginata</i> vista com microscópio eletrônico de varredura. Aumento de 193 vezes. Foto produzida durante o presente trabalho no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.</u>	3
<u>FIGURA 4. Parasitos adultos. À esquerda <i>Taenia solium</i> e à direita <i>Taenia saginata</i>. Exemplares cedidos da coleção do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos.</u>	4
<u>FIGURA 5. <i>Cysticercus cellulosae</i> extraídos de tecido muscular de suíno infectado naturalmente.</u>	28
<u>FIGURA 6. a) inoculação intraperitoneal de <i>Cysticercus longicollis</i> em camundongo do sexo feminino da raça Swiss. b) camundongo 90 dias após inoculação apresentando abdômen repleto. c) camundongo imobilizado após eutanásia. d - h) incisão abdominal até extração dos cisticercos. i) placa com cerca de 300 cisticercos imediatamente após laparotomia.</u>	29
<u>FIGURA 7. Placas com cisticercos após dessecação com <i>Cysticercus longicollis</i> (esquerda) e <i>Cysticercus cellulosae</i> (direita).</u>	31
<u>FIGURA 8. Lâminas para teste de imunofluorescência indireta em processo de incubação.</u>	34
<u>FIGURA 9. Resultado do teste de imunofluorescência indireta com LCR de pacientes portadores ou não de neurocisticercose. Microscópio de imunofluorescência. a) não reagente com <i>C. cellulosae</i>. b) reagente 1/5 com <i>C. cellulosae</i>. c) não reagente com <i>C. longicollis</i>. d) reagente 1/5 com <i>C. longicollis</i>. Aumento de 400 vezes.</u>	35
<u>FIGURA 10. Teste ELISA. a) microplaca sensibilizada com antígeno. b) microplaca após reação imunoenzimática visualizando-se orifícios com alteração cromática.</u>	37
<u>FIGURA 11 – ÍNDICES EPIDEMIOLÓGICOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, CURITIBA – PARANÁ – BRASIL 2000. FONTE: TABELA 14</u>	61
<u>FIGURA 12 - ÍNDICES EPIDEMIOLÓGICOS DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO, CURITIBA – PARANÁ – BRASIL 2000. FONTE: TABELA 14</u>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Cc</i>	- <i>Cysticercus cellulosae</i>
CDC	- Centers Disease Control and Prevention
CID	- Centro de Investigação de Doenças
<i>Cl</i>	- <i>Cysticercus longicollis</i>
CPPI	- Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
CSA	- Centro de Saúde Ambiental
DO	- Densidade Óptica
ELISA	- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HC	- Hospital de Clínicas
IFI	- Imunofluorescência Indireta
ISEP	- Instituto de Saúde do Paraná
LACEN	- Laboratório Central do Estado
LCR	- Líquido Cefalorraquiano
mod.	- modelo
NC	- Neurocisticercose
OPD	- Ortofenildiamina
PBS	- “Phosphate Buffer Solution”
RNM	- Ressonância Nuclear Magnética
SEAB	- Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná
SESA	- Secretaria de Estado da Saúde do Paraná
SIF	- Serviço de Inspeção Federal
SINAN	- Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SIP	- Serviço de Inspeção do Paraná
SNC	- Sistema Nervoso Central
SUS	- Sistema Único de Saúde
TAC	- Tomografia Axial Computadorizada
TC	- Teniose e Cisticercose
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

RESUMO

Duas provas de imunodiagnóstico foram padronizadas em Curitiba, Paraná, Brasil, 2000: imunofluorescência indireta (IFI) e reação imunoenzimática (ELISA), para pesquisa, em líquido cefalorraquiano, de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* de 39 indivíduos com neurocisticercose portadores de cistos vivos ou em degeneração, confirmado por tomografia axial computadorizada. Dois antígenos foram estudados: um homólogo (*Cysticercus cellulosae*) e outro heterólogo (*Cysticercus longicollis*). O rendimento de líquido vesicular de *Cysticercus longicollis* na produção dos antígenos de IFI e ELISA foi significativamente superior ao de *Cysticercus cellulosae*. Para *Cysticercus cellulosae* foram utilizados apenas escólices, membranas parasitárias e extrato salino total em função do pequeno rendimento de líquido vesicular. Para a técnica de IFI o número de partículas, por campo, no aumento de 400x ficou estabelecido em 20 a 30. A diluição do conjugado foi 1:250. O teste de ELISA ficou assim padronizado: Concentração de antígeno: 1µg/orifício; Diluição do líquido cefalorraquiano: 1/1; Diluição do conjugado: 1: 3000; ponto de corte – *C. cellulosae* DO • 0,210; ponto de corte – *C. longicollis* DO • 0,306. Quando comparado ao padrão ouro e ao teste sorológico com antígeno homólogo, caracterizando o diagnóstico de certeza definitivo, a sensibilidade no teste de imunofluorescência indireta, foi de 90,6%, considerando o número total de amostras analisadas (39), variando de 90,5% para amostras de pacientes com cistos em atividade a 90,9% para amostras de pacientes com calcificações no encéfalo. Quando se trabalhou com o teste imunoenzimático a sensibilidade para o mesmo grupo de amostras foi de 90,9%, variando de 95,2% a 83,3%, respectivamente para amostras de pacientes com cistos em atividade e para amostras de pacientes com calcificações no encéfalo, igualmente com diagnóstico de certeza definitivo para neurocisticercose. O antígeno heterólogo pode ser utilizado como alternativa ao antígeno homólogo. O rendimento e o controle das variáveis ambientais na manutenção da cepa e os indicadores dos testes permitem a utilização deste componente biológico para produção de extratos antigênicos destinados a pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em líquido cefalorraquiano.

ABSTRACT

Two immunodiagnosis tests were standardised: indirect fluorescent antibody test (IFAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), for the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies, in cerebrospinal fluid (CSF), in carriers of neurocysticercosis (with alive or degenerating cysticerci). Two antigens were studied: a homologous (*Cysticercus cellulosae*) and a heterologous (*Cysticercus longicollis*) antigen. For the production of *Cysticercus longicollis* antigen only the vesicular fluid was used on the ELISA test, which was much superior than *Cysticercus cellulosae*. For *Cysticercus cellulosae*, the parasitic membranes of the scolex and total saline extract were used due to the small yield of the vesicular liquid. For IFAT the number of particles was established in 20 to 30 (for field, increase of 400x). The conjugate concentration used was 1:250. The ELISA test was standardised: antigen concentration: 1µg/well; dilution of the CSF: 1/1; dilution of the conjugate: 1: 3000; cut-off to *C. cellulosae* was 0,210 and cut-off to *C. longicollis* was 0,306. When compared to the gold standard and the serologic techniques with homologous antigen, characterizing the definitive diagnosis, the IFAT sensitivity was of 90,6%, considering the total number of analyzed samples (39), being 90,5% for patients' samples with cysticerci in activity and 90,9% for patients' samples with calcifications in the encephalon. As for the ELISA test the sensitivity for the same group of samples was of 90,9%, being from 95,2% and 83,3%, for patients' samples with cysticerci in activity and for patients' samples with calcifications respectively, equally with definitive certainty diagnosis for neurocysticercosis. The heterologous antigen can be used as alternative to the homologous antigen. The revenue and the control of the environmental variables in the maintenance of the stump and the indicators of the tests allow the use of this biological component for production of extracts destined antigens for the research of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in CSF.

1. INTRODUÇÃO

A neurocisticercose constitui grave problema de saúde pública para a maioria dos países em desenvolvimento (FIGURA 1). Em 1993, a Força Tarefa Internacional para Erradicação de Doenças considerou-a potencialmente erradicável com os recursos existentes (CDC,1993, p. 11). Contudo, a ausência de dados epidemiológicos confiáveis representa, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde, sério obstáculo para o planejamento de campanhas de prevenção e de erradicação. A implantação da notificação compulsória internacional da cisticercose humana facilitaria a avaliação mais precisa das taxas de incidência e de prevalência, viabilizando a erradicação da neurocisticercose (ROMAN, 2000).

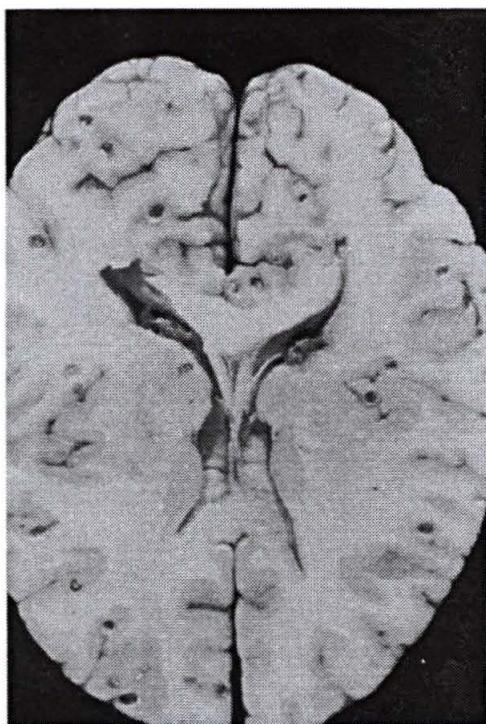


FIGURA 1. Secção de um cérebro humano com grande quantidade de cisticercos intraparenquimatosos.
Foto cedida pelo Prof. Dr. Affonso Antoniuk.

No Brasil, os dados de positividade das diversas manifestações do ciclo parasitário em homens e animais são numerosos, porém, dispersos. Referem-se, em grande parte, a dados de serviços de diagnóstico por

imagem através de tomografia axial computadorizada e ressonância nuclear magnética segundo VAZ (1993, p. 6), e com boa aproximação permitem a construção de indicadores de incidência e prevalência (FIGURA 2).

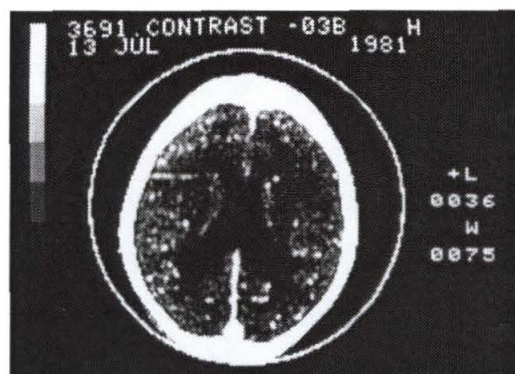


FIGURA 2. Imagem de tomografia axial computadorizada de um cérebro humano com múltiplos cisticercos. Fonte: Hospital Nossa Senhora das Graças.

O Ministério da Saúde não contempla o complexo teniose e cisticercose como doença de notificação obrigatória (BRASIL, 1999).

No Estado do Paraná existem focos do complexo teniose e cisticercose em todas as 22 Regionais de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (BRASIL, 2000). Há significativa disseminação das formas infectantes, atingindo a população humana, rebanhos bovino e suíno, principalmente os criados em regime de liberdade e que fazem coprofagia direta ou indireta. A contaminação do meio ambiente expõe ao risco os consumidores de alimentos, em especial de frutas rasteiras, hortaliças e mananciais de água potável (GUSSO, 1997, p. 458).

Na área animal a falta de inspeção sanitária do abate de suínos e bovinos em diversas regiões do país dificulta análises epidemiológicas (FIGURA 3). Os dados existentes sobre o abate de bovinos e suínos demonstram coeficientes de positividade em todas as macro-regiões do Estado (BRASIL, 2000). Os dados originados dos serviços de inspeção no Paraná são contrastantes. O Serviço de Inspeção Federal (SIF) no Paraná divulgou em 1993 que 0,03 % de carcaças suínas foram condenadas enquanto que o Serviço de Inspeção do Paraná (SIP) aponta para coeficientes de positividade, para cisticercose em suínos, entre 3 e 5% (1994) conforme a região do Estado onde esteja localizado o matadouro. Bem verdade que estes índices podem chegar a ser alarmantes, como por exemplo em duas comunidades rurais da região sul do Estado, Tigre e

Postinho, os coeficientes de positividade para cisticercose suína foram de 12 e 27% respectivamente (ARRUDA, 1990, p. 420).

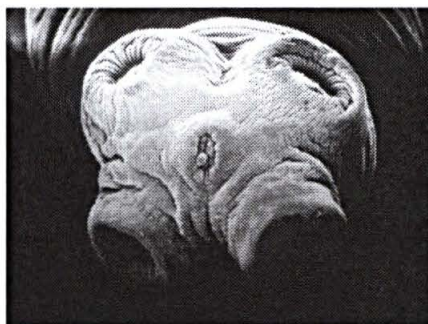


FIGURA 3. Imagem de escólex de *Taenia saginata* vista com microscópio eletrônico de varredura. Aumento de 193 vezes. Foto produzida durante o presente trabalho no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Um dos principais indicadores epidemiológicos do complexo teniose e cisticercose é a cisticercose suína, fato justificado pelos hábitos alimentares e forma de vida destes, bem como, seu tropismo por excrementos humanos (coprofagia). Os dados de cisticercose suína sistematizados são os que melhor podem avaliar uma ação de controle em um determinado município ou região.

Os percentuais de positividade para *Taenia spp* (FIGURA 4) diagnosticados nos serviços de saúde variam de 0,5 a 5% mas são pouco adequados a configurar prevalências (BRASIL, 2000). Os métodos coproparasitológicos utilizados na rede pública de saúde apresentam sensibilidade para *Taenia spp* próxima a 30% (HOFFMANN, 1987, p. 75). Os métodos de pesquisa de coproantígenos ainda não estão disponíveis na rede pública (BRASIL, 2000). A presença de ovos de helmintos, em lodo de esgoto, tem sido pesquisada em Curitiba. Ovos de *Taenia sp*, foram observados em 1,7% das amostras na Estação de Tratamento de Esgoto Belém, em Curitiba (THOMAZ-SOCCOL; PAULINO; CASTRO, 1996, p. 5). A companhia de saneamento abastece apenas 9% das 3.400 comunidades rurais (BRASIL, 1998).

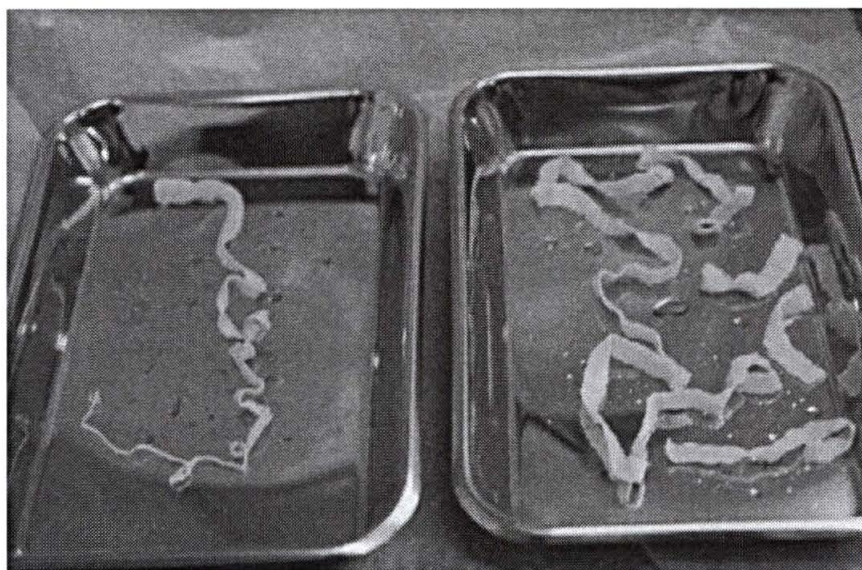


FIGURA 4. Parasitos adultos. À esquerda *Taenia solium* e à direita *Taenia saginata*. Exemplos cedidos da coleção do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos.

Os percentuais de positividade sugestivos para neurocisticercose nos centros tomográficos realizados em 9 Regionais de Saúde (1988 a 1992), apresentaram percentuais de positividade de 3,4 a 19,7%, entre pessoas que procuraram diagnóstico por imagem. Os dados referem-se a 51.932 exames tomográficos realizados em todo o Estado do Paraná (BRASIL, 2000).

Assim, o número de casos de cisticercose humana notificados e confirmados no Paraná (1993-2000), o coeficiente de incidência/100.000 habitantes de neurocisticercose (1993-2000), o coeficiente de letalidade (1993-1999), a positividade para *Taenia spp*, as freqüências por sexo e ocupação, bem como, os grupos etários mais atingidos demonstram a dimensão do problema (BRASIL, 2000).

A identificação de focos de transmissão de *T. solium* e o tratamento em massa de pessoas com praziquantel ou niclosamida podem ajudar a eliminar os grandes focos, porém, para acompanhar a eficácia de tais tratamentos, faz-se necessário desenvolver provas diagnósticas mais sensíveis, aprimorando a vigilância epidemiológica e a avaliação das intervenções (CDC, 1993, p. 11).

O pleomorfismo da neurocisticercose tem imposto o uso de diversos procedimentos diagnósticos. A maioria dos estudos tem sido realizados por técnicas não invasoras de imagem, como tomografia axial computadorizada e ressonância nuclear magnética. Como procedimentos complementares se

utilizam técnicas imunológicas para determinar anticorpos no líquido cefalorraquiano. A pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em líquido cefalorraquiano é um importante apoio diagnóstico na clínica médica neurológica (FLISSER; MADRAZO; DELGADO, 1997, p. 23). O ensaio imunoenzimático (ELISA) e a imunofluorescência indireta (IFI) são usadas como apoio diagnóstico em pacientes com quadro neurológico.

O imunodiagnóstico tem a vantagem de ser um procedimento de menor custo, de mais fácil padronização, de boa reprodutibilidade e não ser invasivo. Métodos sensíveis e específicos para imunodiagnóstico da cisticercose podem contribuir na construção de indicadores epidemiológicos confiáveis.

Assim, visando oferecer à comunidade científica e aos profissionais, que trabalham na prevenção e controle da zoonose, métodos acessíveis, de reduzido custo e confiabilidade para avaliar programas de controle e estudos epidemiológicos foi desenvolvido o presente trabalho. Ele tem como objetivo a padronização e comparação de métodos imunodiagnósticos para pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em líquido cefalorraquiano usando antígeno homólogo e heterólogo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O complexo teniose¹ e cisticercose é uma antropozoonose clássica, reconhecida desde a antigüidade (PAWLOWSKI; SCHULTZ, 1972, p. 269). A neurocisticercose é a parasitose mais freqüente do sistema nervoso central, cuja infecção é causada pelos estágios larvais da *Taenia solium* (Linnaeus, 1758), denominados *Cysticercus cellulosae* (Gmelin, 1790). O ciclo de vida em dois hospedeiros envolve seres humanos como hospedeiros definitivos e suínos como hospedeiros intermediários.

Uma das primeiras citações deste complexo é feita por Malpighi, 1697 (*in Flisser, Madrazo; Delgado, 1997, p. 01*) que descreveu em animais a natureza dos cistos e o escólex. Goeze (1789) e Werner (1786) demonstraram a identidade das doenças do homem e do porco. Zeder em 1800 cria o gênero *Cysticercus*. Kuchenmeister (1855 *in Flisser, Madrazo; Delgado, 1997, p. 01*) demonstrou que a *Taenia* se desenvolvia a partir de cisticercos. Rumler (1858 *in Flisser, Madrazo; Delgado, 1997, p. 02*) foi o primeiro a comunicar um caso de cisticercose humana, descrevendo um tumor no sistema nervoso central de um indivíduo epilético.

A cisticercose era doença disseminada em alguns países europeus, como a Alemanha, até os fins do século passado. Após a instituição da profilaxia apropriada, tornou-se pouco freqüente naquele continente. Continua, porém, sendo importante em países em que a higiene, é ainda, muito rudimentar (PESSOA; MARTINS, 1988, p. 448).

Na área de diagnóstico da neurocisticercose a Reação de Fixação de Complemento (RFC) foi a primeira a ser sistematicamente utilizada (LANGE, 1940, p. 38). Ela foi padronizada em 1909, quando WEINBERG usou-a para detectar anticorpos em carneiros com hidatidose. Em 1911, MOSES adaptou-a para detecção de anticorpos em soro e líquido cefalorraquiano humanos. A partir daí e ao longo do tempo foi sofrendo

¹ O termo teníase deve ser utilizado doravante como teniose, atendendo recomendação da Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária e da Federação Mundial de Parasitologistas, com objetivo de uniformizar a terminologia das parasitoses (FLISSER; MADRAZO; DELGADO, 1997, p. 02).

modificações principalmente no que se refere a obtenção de extrato antigênico(COSTA; FERREIRA; MAKINO, 1982, p. 337-341).

A prova de imunofluorescência indireta para neurocisticercose foi introduzida na década de 70 e trouxe novas perspectivas diagnosticas ampliando os elementos de investigação da enfermidade. (LIVRAMENTO,1981, p. 262). O método foi simplificado empregando-se partículas deslipidizadas de *Cysticercus cellulosae* com ensaio em líquido cefalorraquiano (MACHADO; CAMARGO; HOSHINO, 1973, p.182).

O teste imunoenzimático foi descrito pela primeira vez por ARAMBULO, WALLS e BULOCKS (1978, p. 63-67) empregando 49 soros de pacientes com suspeita clínica de cisticercose e obtendo positividade comparável a de outras técnicas. No Brasil, o teste imunoenzimático foi introduzido utilizando líquido cefalorraquiano, relatando índices de sensibilidade e especificidade de 100% (COSTA; FERREIRA; MAKINO, 1982, p. 337-341).

2.2 O PARASITO: *Taenia solium*

2.2.1. Posição Sistemática

A *Taenia solium* pertence: ao *phylum Platyhelminthes*

à classe *Cestoda*

à ordem *Cyclophyllidea*

à família *Taeniidae*

2.2.2. Morfologia

A *Taenia solium* é um parasito formado por um escólex, colo e estróbilo com numerosas proglotes. O parasito mede de 2 a 3 metros de comprimento, porém pode alcançar até oito ou nove metros. O escólex é formado por quatro ventosas e um rostro que possui dupla coroa de acúleos: a interna formada por 11 a 14 ganchos (de 0,13 a 0,16 mm) e a externa, com igual número de ganchos pequenos - 0,10 a 0,12 mm. São desprovidos de aparato digestivo.

O estróbilo é constituído de unidades repetidas ou proglotes em diferentes estágios de desenvolvimento. As proglotes mais próximas ao

pescoço são imaturas já que não tem desenvolvido os órgãos sexuais. As proglotes maduras contém órgãos sexuais masculinos e femininos. O aparelho reprodutor masculino consiste em numerosos testículos dispersos na proglote conectados por meio de túbulos finos a um espermoduto enrolado. O final se encontra modificado para formar um órgão muscular copulatório chamado cirro. O espermoduto chega ao poro genital, no qual também desemboca a vagina, que é o conduto feminino. Este recebe os espermatozóides e os conduz ao receptáculo seminal e se conecta com o oviduto. O ovário é formado por dois lóbulos grandes e um pequeno. Libera os óvulos para o oviduto onde se processa a fertilização dentro da mesma proglote.

Os ovos se acumulam no útero que tem uma região central e ramificações laterais. No próprio útero os ovos se tornam maduros e infectantes. Os últimos segmentos são grávidos e essencialmente constituem sacos repletos de ovos. Cada proglote grávida mede meio a dois centímetros e contém grande número de ovos, de 30 a 40 mil, podendo alcançar 80 mil.

Em geral um ser humano parasitado libera de dois a cinco segmentos, duas a três vezes por semana. Alguns indivíduos podem expelir 12 ou mais proglotes em um só dia. Os ovos são esféricos e tem aparência radial quando observados ao microscópio. Medem de 30 a 40 μm de diâmetro, possuindo cor acinzentada. A casca mede até três μm de espessura, sendo formada por delgados bastonetes ou prismas de natureza quitinosa, cimentados por uma substância de natureza calcária.

O embrióforo, quando ativado, se transforma em embrião hexacanto, cuja manifestação principal é o movimento dos acúleos, que também são denominados *oncosferas infectantes*. O escólex do cisto é idêntico ao do parasito adulto. Aos 50 dias o rostelo já está formado por completo. O embrião hexacanto só abandona seu embrióforo no interior do tubo digestivo do hospedeiro intermediário. A casca fragmenta-se no suco intestinal alcalino, pondo em liberdade o embrião ou oncosfera infectante. O embrião insinua-se, com auxílio dos acúleos entre os elementos anatômicos da mucosa intestinal e chega à luz dos capilares, especialmente dos venosos. O embrião como um êmbolo vivo, é lançado na circulação, e esse corpo estranho acaba por parar nos capilares (PESSOA; MARTINS, 1988, p. 448-464).

2.2.3. Ciclo Biológico

A ingestão de ovos viáveis de *Taenia solium* ocasiona no hospedeiro intermediário, a cisticercose. A fase de larva se desenvolve em vários mamíferos como o gato, cão, macaco e principalmente no suíno, e seres humanos. O homem pode igualmente infectar-se, porém, é um hospedeiro acidental não contribuindo para a continuidade do ciclo biológico. Os cisticercos se localizam principalmente no sistema nervoso central, olhos, músculo esquelético e tecido conjuntivo dos hospedeiros intermediários (FLISSER; MADRAZO; DELGADO, 1997, p. 05-17).

Fixado no parênquima de um tecido, o embrião perde os acúleos, torna-se vesiculoso, aumenta de tamanho, ocorrendo a evaginação de um ponto de sua parede, a qual, por brotamento, forma a cabeça. Forma-se a larva madura num espaço de até três meses. Este cisto é denominado *Cysticercus cellulosae*. O cisto se apresenta como uma vesícula globosa medindo 15 milímetros de comprimento por sete ou oito de largura, dependendo da pressão dos tecidos sobre ela. A vesícula é cheia de um líquido que se assemelha ao líquido cefalorraquiano, contendo sais e proteínas, bem como derivados protéicos, como ácido úrico, uréia e creatinina (PESSOA; MARTINS, 1988, p. 448-464).

Quando um ser humano ingere carne suína crua ou insuficientemente cozida que contenha um ou mais cisticercos vivos, o escólex do parasita evagina-se estimulado pelo suco biliar e enzimas digestivas. As ventosas se aderem à mucosa do intestino delgado e induzem a protusão dos acúleos. Após 3 ou 4 meses desenvolve-se então, uma *Taenia solium* adulta, que expulsará proglotes maduras ou grávidas nas matérias fecais, completando o ciclo biológico (FLISSER; MADRAZO; DELGADO, 1997, p. 06).

O parasito adulto desenvolve-se exclusivamente no intestino delgado do homem. Os portadores de *Taenia solium* são praticamente assintomáticos e podem albergar o parasita por até 20 anos, caracterizando a teniose. Sistemáticamente eliminam proglotes, contendo ovos, no meio ambiente, através das fezes, contaminando de forma direta ou indireta alimentos, pastagens e água.

O ser humano pode ao mesmo tempo ser hospedeiro definitivo e hospedeiro intermediário. Na condição de hospedeiro intermediário o homem deve se contaminar com ovo cujo embrião poderá localizar-se no olho e sistema nervoso central ocasionando a neurocisticercose. Para o homem ser hospedeiro intermediário três são as vias de infecção: auto-infecção interna, auto-infecção externa e hetero-infecção.

A auto-infecção interna ocorre quando um portador de teniose sofre movimentos antiperistálticos e os ovos sofrem a ação dos sucos digestivos alcançando a circulação. A auto-infecção externa ocorre com a ingestão acidental de ovos de *Taenia spp* do próprio hospedeiro, freqüentemente por maus hábitos higiênicos. A hetero-infecção acontece quando se dá a ingestão de ovos por consumo de água poluída ou em hortaliças insuficientemente higienizadas e na coabitação com portadores de *Taenia solium* (PESSOA; MARTINS, 1988, p. 448-464).

2.3 ASPECTOS PATOLÓGICOS DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA

A neurocisticercose humana é uma enfermidade complexa cujas manifestações clínicas principais dependem da localização, estágio e número de cistos no sistema nervoso central. O grau de reação inflamatória induzida pelo parasito e o estado clínico do hospedeiro também são fatores importantes na resposta imunológica (FLISSER; MADRAZO; DELGADO, 1997, p. 29-32).

SOTELO; GUERREIRO e RUBIO (1985, p. 442-445), propõem uma classificação para a neurocisticercose humana como ativa, quando os parasitos estão vivos, independentemente das conseqüências que possam causar ao hospedeiro. Ou, como inativa, nos casos que apresentem calcificações ou fibroses. Quando o parasita está em contato com as meninges ocorre uma reação inflamatória grave e progressiva, com proliferação cicatricial. Podendo ocasionar obstrução mecânica da circulação de líquido cefalorraquiano.

As crises convulsivas são as manifestações clínicas mais freqüentes, seguidas de hipertensão intracraniana, cefaléia e estado mental alterado. Os cisticercos encontrados no músculo e tecido subcutâneo raramente originam

sintomas e são bem tolerados, provavelmente por se encontrar em número reduzido (FLISSER; MADRAZO; DELGADO; 1997, p. 29-32).

2.4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO COMPLEXO TENIOSE E CISTICERCOSE

2.4.1. Cisticercose Animal

Segundo dados do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, ocorreu a condenação de 0,56 e 0,39% das carcaças suínas abatidas no Brasil, em 1986 e 1987 respectivamente, observando-se maior número de registros no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (VILLA, 1995, p. 8-11).

O número de casos confirmados e percentuais de cisticercose bovina, no Estado do Paraná, entre 1989 e 1998 (excluídos os anos de 1992 e 1993) foi de 204.044 (3,4%) condenações, sobre o total de abates de 5.929.143. Houve um sensível aumento, de 2,7% verificado em 1989 para 4,8% em 1998. Apesar deste aumento em 1998, apresenta-se constante o percentual de positividade ao longo dos últimos dez anos (BRASIL, 2000).

No mesmo período os municípios que mais abateram bovinos foram: Paranaíba (751.272 bovinos inspecionados) e Umuarama (578.094 bovinos inspecionados), com 26.903 (3,6%) e 28.180 (4,9%) condenações, respectivamente. (BRASIL, 2000). Os maiores índices foram em Pato Branco (7,3%), União da Vitória (5,5%), Região Metropolitana de Curitiba e Paranaguá (5,0%) e Campo Mourão (4,9%) indicando áreas que podem ser selecionadas para implantação de programas de controle. No entanto, a cisticercose ocorreu em bovinos de todas as regiões do Paraná.

O número de casos confirmados e percentuais de cisticercose suína no Estado do Paraná, entre 1989 e 1997 (excluídos os anos de 1992, 1993 e 1995) foi de 1.413 (0,0132 %) condenações, sobre o total de abates de 13.270.991. Esses dados mostram que a cisticercose em suínos abatidos pelo SIF é quase inexistente (BRASIL, 2000). No entanto, os animais abatidos em estabelecimentos, sob regime de inspeção federal, provém de estabelecimentos criacionais tecnificados e que usam alta tecnologia evitando a coprofagia e fornecendo alimentos praticamente isentos de ovos de *Taenia spp.* Outrossim, a realidade das criações de suínos soltos é contrastante com

as criações industriais. Os animais tem acesso a diversos tipos de alimentos, inclusive ao consumo de fezes humanas em regiões carentes de infraestrutura sanitária.

2.4.2. Teniose e o Meio Ambiente

Há significativa disseminação de todas as formas do ciclo parasitário, atingindo a população humana, rebanhos bovino e suíno, principalmente os criados em regime de liberdade e que fazem coprofagia. O meio ambiente sofre pressão de contaminação, expondo ao risco os consumidores de alimentos, em especial os de frutas rasteiras, hortaliças e mananciais de água potável (GUSSO, 1997, p. 461).

Os percentuais de positividade, para *Taenia spp*, diagnosticados na rede do SUS variam de 1 a 5% (GUSSO,1997, p. 459). É importante considerar que o método de sedimentação espontânea de Lutz (1919) e descrito por Hoffmann, Pons & Janer (1934) apresenta sensibilidade para *Taenia spp* de 30 % e que uma única amostra de matéria fecal para detectar ovos de *Taenia spp* é pouco sensível porque menos de 50 % dos portadores são detectados com uma única amostra (HOFFMANN, 1987, p. 75).

Os serviços de saúde não dispõem ainda de métodos para detecção de coproantígenos, que tem a grande vantagem de não gerar reações cruzadas com outros helmintos, incluindo *Hymenolepis nana*.

A prevalência da *Taenia spp*. no Brasil varia de 0,21 a 2,83% (VILLA, 1995, p.8-11).

A presença de ovos de helmintos e cistos de protozoários em lodo tratado pelo processo aeróbio revelou a presença de ovos de vários nematóides e de cestóides *H. nana*, *H. diminuta* e *Taenia sp.* viáveis. Também em reatores anaeróbios de lodo fluidificado foram encontrados ovos de *Taenia spp*. (THOMAZ-SOCCOL; PAULINO; CASTRO, 1996, p. 5).

A positividade para *Taenia spp*, em 257.588 exames coproparasitológicos (1990-1991) foi de 1,42% perfazendo 3.219 casos positivos (GUSSO, 1999, p. 45-46). No período compreendido entre 1992 a 1995 o número de casos de teniose humana diagnosticados por exames parasitológicos de rotina, no município de Curitiba, foi de 900 (0,4%), num total de 234.594 exames realizados, indicando a prevalência do ciclo no meio

urbano mais desenvolvido do Estado, cuja infra-estrutura sanitária conta com estações de tratamento de resíduos sólidos urbanos domiciliares e industriais. Além disso, observa-se a constância da teniose em termos percentuais de 0,3 a 0,5% (BRASIL, 2000).

O número e percentual de casos de teniose humana (1990-1995) foi de 3.835, perfazendo 0,5 % de um total de 755.097 exames de rotina realizados (BRASIL, 2000). Para cada 1000 pessoas apenas 5 (0,5%) tem teniose, configurando um índice muito baixo. Os baixos coeficientes de positividade podem estar relacionados aos tipos de exames realizados, com baixa sensibilidade, não refletindo a realidade. Os coeficientes de incidência por 100.000 habitantes, de teniose, no mesmo período foram anualmente de 11,6 ; 11,6; 11,3 ; 8,5 ; 23,7 e finalmente de 16,0 em 1995 (BRASIL, 2000). O coeficiente de incidência entre 11,6 a 23,7 é baixo, possivelmente pelas reduzidas sensibilidades dos exames utilizados.

Contribuem ainda para reduzir os percentuais de positividade de teniose fatores como a maior realização de exames coproparasitológicos em crianças, na medida em que na fase adulta poucos utilizam-se deste procedimento diagnóstico. Portanto, não é um indicador eficiente para inferências epidemiológicas pelos motivos citados.

O número de casos de portadores de teniose no período de 1990 a 1996, por Regional de Saúde, variou de 8 na Regional de Saúde de Paranaguá a 961 na Regional de Curitiba, para um total de 4.151 casos diagnosticados de *Taenia spp* em todo o Estado. Apesar dos dados serem pouco representativos eles demonstram que há todas as condições para perpetuação do ciclo biológico do complexo teniose e cisticercose em todo o Estado.

2.4.3. Cisticercose Humana

a) No Mundo

A distribuição da cisticercose é universal, sendo freqüente na América Latina, na África e na Ásia (OPS,1994, I.1.3). Também são registrados casos na Espanha, Estados Unidos , Portugal e Reino Unido (FLISSER; MADRAZO; DELGADO, 1997, p. 61). Existem 50 milhões de casos do complexo teniose e

cisticercose, estimando-se em 50.000 o número de óbitos por ano, em todo o mundo (CDC,1993, p. 11).

Esta infecção é devida a *Taenia solium* e *Taenia saginata* (Goeze,1782). A vigilância para identificação de focos de transmissão de *Taenia solium* e o tratamento em massa de pessoas com praziquantel ou niclosamida podem ajudar a eliminar os grandes focos. Porém, para acompanhar a eficácia de tais tratamentos faz-se necessário desenvolver provas diagnósticas mais sensíveis, aprimorando a vigilância epidemiológica e a avaliação das intervenções (CDC,1993, p. 11).

Em países desenvolvidos como a Alemanha conseguiu-se controlar o complexo TC através de medidas baseadas na inspeção sanitária de carnes, saneamento básico e educação sanitária, associados ao desenvolvimento social e econômico. Entre os países em desenvolvimento, Equador e México (PROÃÑO,1994, p. 45-48) levaram a cabo programas de controle em pequenas comunidades (10.000 habitantes) baseados em educação sanitária e distribuição em massa de medicamentos antiparasitários (praziquantel). Foram programas de elevado custo e pouco exeqüíveis à realidade cultural e econômica brasileira.

b) No Brasil

A freqüência de neurocisticercose em Centros de Neurologia do Brasil tem variado de 2,9 a 3,39% (VILLA, 1995, p.8-11). Na região de Ribeirão Preto, São Paulo , TAKAYANAGUI e JARDIM (1983, p. 63) analisando prontuários, no período de 1956 a 1979, observaram 500 casos de neurocisticercose correspondendo, respectivamente, a 2,7% e 7,5% dos atendimentos em ambulatório e enfermaria.

Na cidade de Uberlândia, Estado de Minas Gerais verificou-se a ocorrência de cisticercose humana em 1,4% nas 2.862 necropsias realizadas entre 1971 e 1993 (COSTA-CRUZ, 1995, p. 228).

Ainda em Uberaba, cidade do Estado de Minas Gerais, após revisarem 1596 protocolos de necropsia no período de 1974 a 1997, registrando-se a idade, sexo, cor, índice de massa corporal e a localização do cisticerco, e neurocisticercose encontraram-se relatos de cisticercose em 53 (3,3 %) protocolos. A média das idades foi de 50 +/- 15,4 anos (variando de 15 a 86 anos), 62,3 %

eram homens, 64,1 % brancos. As localizações encontradas foram: encefálica (79,2 %), cardíaca (22,6 %), muscular esquelética (11,3 %) e outras (LINO; REIS; TEIXEIRA, 1999, p. 498).

A mortalidade humana notificada e atribuída ao complexo teniose e cisticercose pode estar subestimada, pois, eventualmente os óbitos são registrados pelos sintomas prementes à morte e não pela causa primária.

c) No Estado do Paraná

Em 1994, o Estado do Paraná instituiu a notificação obrigatória da teniose e cisticercose humanas e implantou o Programa Estadual de Controle da Teníase e Cisticercose (PARANÁ,1994). Em 1995 foi implantado o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) que possibilitou o registro das informações preexistentes coletadas em todo o Estado sobre o complexo teniose e cisticercose. As informações epidemiológicas apresentadas no presente estudo no ano 2000 referem-se ao período janeiro a junho e foram extraídas do referido sistema.

As ações para o controle da teniose e cisticercose fundamentaram-se a partir de estudos desenvolvidos em municípios das regiões centro-sul e norte do Paraná (1980). Foram operacionalizadas as atividades de vigilância epidemiológica, controle de focos (praziquantel/mebendazol), notificação obrigatória da teniose e cisticercose humanas, tratamento em massa (1.283.000 pessoas/48 municípios/distribuição do medicamento casa a casa), confecção de instrumentos para educação coletiva, imunodiagnóstico, produção de antígenos, construção de 34.178 módulos sanitários e implantação de serviços municipais e regionais de inspeção do abate. A integração das áreas de saúde, meio ambiente, educação e agricultura foi fundamental. A mobilização de profissionais e da comunidade na divulgação do problema destacou-se como a principal estratégia de controle (GUSSO,1999, p 45-46).

A implantação da notificação obrigatória da cisticercose humana já permite dimensionar o problema, pois o caráter de cronicidade da cisticercose humana e os períodos variáveis de surgimento dos primeiros sinais no homem não permitem que apenas os dados de notificação sejam o indicador epidemiológico ideal.

Os percentuais de positividade sugestivos para neurocisticercose em centros tomográficos de nove Regionais de Saúde do Estado do Paraná, no período de 1988 a 1992, revelaram valores médios de até 3,4 a 19,7%, entre pessoas que procuraram o serviço por diversos motivos de encaminhamento neurológico. Chama a atenção percentuais até quatro vezes acima da média do Estado, como em Guarapuava 47 casos (19,7%), União da Vitória 114 casos (19,3%) e Pato Branco 24 casos (15%). Estes altos percentuais podem estar relacionados a fatores ambientais, como por exemplo, as enchentes do Rio Iguaçu, facilitando a dispersão de ovos de *Taenia spp* no meio ambiente. Ainda podem ser considerados aspectos culturais, cujas regiões foram colonizadas por diversas etnias que tem hábitos de consumir carne crua ou insuficientemente cozida. O número de tomografia axial computadorizada positivas foi de 2.509 (4,8%) no universo de 51.932 exames tomográficos realizados.

O número de casos de neurocisticercose humana notificados no período de 1980 a 2000 foi de 4.040 casos. No período compreendido entre 1980 a 1992 o número de casos confirmados foi de 2.509. De 1993 a 2000, já com o sistema de notificações implantado o número de casos de neurocisticercose humana confirmado foi de 1.531. O nível se mantém ao longo dos anos com constância e o ciclo continua existindo no Paraná. Há uma tendência endêmica. A tomografia axial computadorizada, como principal exame diagnóstico, com percentual de 89,3%, possibilitou a descoberta da doença, mostrando ser elevado o número de casos. Os critérios para o diagnóstico de 563 (amostra estudada) casos de neurocisticercose humana no período de 1993 a 2000 (destacando-se o número de casos e a frequência) foram: tomografia axial computadorizada (503/89,3%); radiografia de crânio (34/6,0%); (12/2,1%); cirurgia (9/1,6%); necropsia (5/0,9%).

Em vinte anos (1980-2000) 4.040 casos de neurocisticercose humana foram notificados, sendo considerado um número alto de casos, já que os registros são a partir de 1980. Os casos foram confirmados e notificados pelas clínicas de tomografia computadorizada no Paraná, no período de 1980-1992. No período 1993-2000 os casos foram confirmados e notificados pelo SINAN.

O coeficiente de incidência e o número de casos de neurocisticercose no Paraná de 1993-2000 configura a permanência do ciclo teniose e cisticercose no Paraná. De 1993 a 1995 o coeficiente de incidência foi muito alto em função do estoque de casos que não eram diagnosticados e nem notificados. No período compreendido entre 1996 e 2000 pode-se observar que entre 100.000 habitantes, 1,5 a 2,0 pessoas tem neurocisticercose, inclusive abrangendo todas as regiões.

Em todas as 22 Regionais de Saúde, no período 1993-2000, foram registrados, notificados e confirmados casos de neurocisticercose humana, sendo que a 5ª Regional de Saúde (Guarapuava) apresentou o maior número: 512 (33,4%), seguida da 2ª RS Curitiba com 211 (13,8%) e a 15ª RS (Maringá) com 122 (8,0%) casos. Com relação aos coeficientes de incidência, por 100.000 habitantes, no mesmo período, Guarapuava apontou para 113,4, seguida de União da Vitória com 42,1, Telêmaco Borba com 41,1, Irati com 40,6, Cianorte com 36,3 e Umuarama com 29,4 respectivamente.

Para cada 100.000 habitantes 16,3 tem neurocisticercose, em média, no Paraná, configurando-se nas Regionais de Irati, União da Vitória e Guarapuava, coeficientes extremamente altos.

Para estudar a incidência/100.000, foi tomada uma amostra com 1065 casos confirmados, em todo o Estado do Paraná. Entre 1993 a 2000, as taxas observadas anualmente foram: 2,0%, 3,1%, 4,8%, 1,4%, 1,9%, 1,7%, 1,7% e 0,4% respectivamente. O mesmo coeficiente de incidência/100.000 habitantes de neurocisticercose humana (1993-2000) foi de 12,2 entre as diversas faixas etárias, mostrando-se mais elevado na faixa etária de 20 anos ou mais, indicando que nessas faixas etárias é maior o risco de adoecer com neurocisticercose. A faixa etária compreendida entre 30-49, apresentou o maior número de casos: 419 (39,3%), com coeficiente de incidência por 100.000 habitantes de 19,9 e tem maior risco de adoecer.

A distribuição proporcional de 1.168 (amostragem selecionada) casos de neurocisticercose humana, segundo o sexo no Paraná de 1993 a 2000*, foi: Masculino 547 (46,8%) e Feminino 621 (53,2%). A distribuição de 100 casos de neurocisticercose humana, segundo o sexo e a ocupação no Paraná, de 1998 a 2000 indicou 38% para o sexo masculino e 62 % para o sexo feminino, destacando-se: dona de casa (33,0%); estudante (21%);

agricultor (20 %); aposentado (9,0 %); serviços gerais (9,0%); sapateiro (1,0%); professor (1,0%). Chama a atenção o fato de cada três casos um ocorrer em dona de casa (categoria mais afetada), mas outras profissões também são acometidas. Pode-se presumir que seja pelo fato de manipular alimentos crus, especialmente legumes e frutos rasteiros.

Em 362 casos estudados de neurocisticercose humana (amostra selecionada), por área de residência, no Paraná (1998-2000) foram encontrados 281 (77,6%) e 81 (22,4%), respectivamente, nas áreas urbana (7.268.899 habitantes) e rural (2.094.622 habitantes). Em ambas as populações o coeficiente de incidência por 100.000 habitantes foi de 3,9 caracterizando que o risco de adoecer é semelhante nas duas áreas. Evidencia-se que o maior número de casos é na região urbana. Não é, portanto, uma endemia predominantemente rural e sim urbano-rural.

O número de óbitos por neurocisticercose humana no Paraná (1979 a 1999) foi de 366 e os coeficientes de mortalidade no mesmo período variaram anualmente de 0,1 a 0,4/100.000 habitantes. A média anual é de óbitos e representou 18,3 por ano. Há manutenção da média anual. A mortalidade caracterizada vem acompanhando os coeficientes de incidência.

Os coeficientes de letalidade de um total de 1.493 casos e 150 óbitos foram de: 17,5; 6,3; 2,1; 14,8; 10,1 ; 20,6 ; 14,6 e 10,0 para os anos de 1993 a 1999 respectivamente. Isso representa dizer que de cada 100 doentes aproximadamente 10 vão a óbito, caracterizando uma doença com alto risco de morrer.

Inquérito sorológico e epidemiológico para cisticercose realizado em 2.180 indivíduos de cinco municípios da região Norte do Estado do Paraná, investigados através da reação de imunofluorescência indireta, 69 (3,2 %) apresentaram títulos significativos de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* (LONARDONI; BERTOLINI; SILVEIRA, 1996, p. 273).

2.5. DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA

São vários os procedimentos utilizados para o diagnóstico da neurocisticercose humana. Entre os métodos radiológicos empregados no passado estão a radiografia simples do crânio, entre outros, mas os mais utilizados a partir de 1980 são a tomografia computadorizada e a ressonância

magnética. Entre os métodos de imunodiagnóstico disponíveis e já padronizados no Brasil estão a reação de fixação de complemento, a imunofluorescência indireta, o método imunoenzimático e a imunoeletrotransferência. Um dos principais componentes das provas para imunodiagnóstico é o antígeno. O antígeno define a especificidade da prova. Ele deve ser de boa qualidade a fim de capturar os anticorpos nas reações em que se adicionam conjugados.

2.5.1. Técnicas não Invasivas por Imagem

As técnicas de tomografia axial computadorizada e ressonância nuclear magnética são empregadas na identificação de cisticercos no corpo humano, principalmente no sistema nervoso central. São métodos seguros, precisos e permitem obter elevado grau de certeza diagnóstica. Os cisticercos vivos são observados como imagens hipodensas na tomografia axial computadorizada ou podem originar sinais de baixa intensidade na ressonância nuclear magnética, devido a característica cística do parasito. O escólex se visualiza como um grânulo hiperdenso (tomografia axial computadorizada) o que gera um sinal de alta intensidade (ressonância nuclear magnética), quase sempre excêntrico e aderido à parede, dentro da vesícula. Os cisticercos no parênquima cerebral podem ser isolados ou múltiplos, enquanto os subaracnoídeos podem ter uma aparência hipodensa, geralmente sem escólex visível. A ressonância nuclear magnética é especialmente útil por sua propriedade de identificar sinais de degeneração dos cisticercos. Na tomografia axial computadorizada os cisticercos calcificados se visualizam como pequenas áreas arredondadas hiperdensas. Alguns estudos de tomografia axial computadorizada demonstraram que os cisticercos vivos podem ser isodensos em relação ao tecido cerebral, o que pode gerar diagnóstico equivocado (FLISSER; MADRAZO; DELGADO, 1997, p. 19).

2.5.2. Técnicas Imunológicas

O imunodiagnóstico é um procedimento de menor custo em relação a ressonância nuclear magnética e tomografia axial computadorizada. A presença de anticorpos específicos anticisticercos pode confirmar a enfermidade. A pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em líquido cefalorraquiano é um importante apoio diagnóstico na clínica médica neurológica.

Cinco são as principais técnicas atualmente empregadas:

- a) Hemaglutinação passiva – utilizada no diagnóstico da neurocisticercose, com resultados de sensibilidade e especificidade de cerca de 80%. A vantagem da hemaglutinação passiva é a facilidade de sua execução em levantamentos soroepidemiológicos. Em contrapartida apresenta dificuldades na obtenção de lotes homogêneos e estáveis de hemácias sensibilizadas (VAZ, 1993, p.12).
- b) Fixação de complemento - foi padronizada detectando anticorpos em suínos infectados. A sensibilidade está por volta de 70%, variando na dependência do antígeno, do protocolo utilizado e do estágio evolutivo da doença (REIS; BEI; REIS-FILHO, 1979, p. 113).
- c) Imunofluorescência indireta - a técnica de IFI para diagnóstico da neurocisticercose em líquido cefalorraquiano apresenta boa sensibilidade, apesar do seu caráter subjetivo na leitura (SIMONETTI; TEIXEIRA, 1987, p.33).
- d) Teste imunoenzimático - a técnica de ELISA, padronizada em diversos laboratórios para o diagnóstico de múltiplas enfermidades infecciosas e não infecciosas, assim como para cisticercose apresenta índices de sensibilidade e especificidade próximos a 100% (COSTA; FERREIRA; MAKINO, 1982, p. 337).
- e) Imunoeletrotransferência – esta prova foi padronizada com êxito para o diagnóstico da neurocisticercose, resolvendo-se o problema das reações cruzadas, pois emprega uma fração rica em glicoproteínas purificadas de extrato de cisticercos. A prova tem 98% de sensibilidade ao utilizar soro e 95% com líquido cefalorraquiano humano. A especificidade é de 100% com ambos tipos de amostra (FLISSER; MADRAZO; DELGADO, 1997, p. 24).

2.5.3. Produção de Antígenos para Provas de Imunodiagnóstico Humano

A preparação de extratos antigênicos, a partir de larvas de *Cysticercus cellulosae* extraídos de suínos infectados naturalmente, está cada vez mais difícil. Os animais abatidos em frigoríficos, sob inspeção oficial, originam-se

geralmente de propriedades sanitariamente controladas sendo raro obter tecido muscular suíno infectado com grande número de cistos.

Outra forma de obter matéria prima é através da aquisição de suínos em regiões hiperendêmicas, proceder o abate e tentar extrair cisticercos nas quantidades necessárias. Incurções ao meio rural são dispendiosas e requerem deslocamentos para áreas longínquas, sem a garantia de obtenção.

Infecções experimentais em suínos, através da inoculação de ovos de *Taenia solium*, apresentam dois problemas: a dificuldade na obtenção de proglotes e os riscos de contaminação humana e ambiental durante o procedimento.

Partidas de antígenos de larvas de *Taenia solium*, sobretudo de extrato total (membrana parasitária, líquido vesicular e escólex), podem ser responsáveis pela promoção de reações imunológicas inespecíficas, pois é inevitável a presença de proteínas musculares dos suínos (PINTO, 1998, p. 89).

Universalmente é difícil a obtenção de cisticercos de *Taenia solium*, para produzir antígenos homólogos de boa qualidade. De maneira alternativa, também se utilizam antígenos de outros parasitas, como *Taenia crassiceps*, ou por métodos de engenharia genética (LARRALDE; SOTELO; MONTOIA, 1990, p. 926).

A *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) pertence ao phylum *Platyhelminthes*, à classe *Cestoda*, à ordem *Cyclophyllidea* e à família *Taeniidae*. Os hospedeiros definitivos são raposas (*Vulpes vulpes L.*) e a forma larvar pode ser mantida viva em camundongos através de repiques. A reprodução das larvas é assexuada por brotamento (VAZ, 1993, p. 17). A cepa é mantida por passagens intraperitoniais sucessivas, em camundongos fêmeas Balb/c de oito a doze semanas de idade (VAZ; NAKAMURA; BARRETO, 1997, p. 157).

A possibilidade de se produzir antígenos heterólogos obtidos a partir da multiplicação em camundongos, de formas larvárias de *Taenia crassiceps* já foi testada no Brasil. A multiplicação de *Cysticercus longicollis* ocorre em laboratório, com processo controlado, seguro e com facilidade de reprodução por longos períodos. Em extratos antigênicos de *C. longicollis* utilizados na pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano, pelo método ELISA, foi pesquisado por

VAZ (1993, p. 54) que obteve sensibilidade e especificidade de 97,6% e 96,9% respectivamente.

Pacientes apresentando cistos íntegros ou em degeneração apresentaram 100% de positividade para anticorpos da classe IgG no teste ELISA com antígeno de líquido vesicular de *Cysticercus longicollis* em amostras de líquido cefalorraquiano. (BUENO, 1999, p. 71).

No entanto, o antígeno de *Cysticercus longicollis* foi testado para pesquisar anticorpos anti-*Cysticercus bovis*, com baixa reatividade quando comparado com antígenos de *Taenia saginata* e *Taenia solium* segundo MINOZZO (1997, p. 86) e com alta concordância entre os resultados da prova de ELISA indireto com o exame *post-mortem* e exame de língua em suínos. (BIONDI, 1996, p. 56).

Diante do exposto anteriormente, é indispensável aprofundar o estudo da sensibilidade, especificidade e os valores preditivos das provas imunológicas IFI e ELISA a partir do antígeno de *C. longicollis* para pesquisar anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em líquido cefalorraquiano.

O presente trabalho busca a qualificação de mais um antígeno (*Cysticercus longicollis*) para o imunodiagnóstico da neurocisticercose humana, podendo elevar a eficácia dos testes-diagnóstico disponíveis.

3. OBJETIVOS

A proposição desse trabalho foi:

- 1- Comparar o rendimento dos antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* na produção de antígenos destinados aos testes de imunofluorescência indireta e enzimoimunoensaio no diagnóstico da neurocisticercose.
- 2- Comparar as técnicas imunológicas de imunofluorescência indireta e de enzimoimunoensaio na detecção de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em amostras de líquido cefalorraquiano de indivíduos com neurocisticercose utilizando antígeno liofilizado homólogo de *Cysticercus cellulosae* e heterólogo de *Cysticercus longicollis*.
- 3- Calcular a eficácia dos testes de imunofluorescência indireta e enzimoimunoensaio realizados com antígeno de *Cysticercus longicollis*, em amostras de líquido cefalorraquiano com diagnóstico de certeza definitivo da cisticercose humana.

4. METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Para o desenvolvimento do estudo comparativo com amostras de líquido cefalorraquiano humano registrou-se um projeto de trabalho no Banco de Pesquisas da Universidade Federal do Paraná, sob o n.º 200007171.

Para obter amostras no Hospital de Clínicas um projeto de trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC/UFPR – Diretoria de Corpo Clínico. O referido projeto foi apresentado em conformidade às normas éticas estabelecidas na Resolução n.º 196/96 Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL,1996). A aprovação foi emitida em 25 de abril de 2000, estando registrado como: Pesquisa HC n.º 219-023/2000-04.

4.1.1. Obtenção das Amostras de Líquido Cefalorraquiano

As amostras de líquido cefalorraquiano humano foram obtidas nas Seções de Líquor do HC e na de Imunologia do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), que recebe de todas as Regionais de Saúde, amostras para confecção de testes imunológicos para imunodiagnóstico da neurocisticercose.

As amostras selecionadas da Seção de Imunologia do LACEN foram recebidas no período de 01 de julho de 1998 a 15 de agosto de 2000. Na Seção de Líquor do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR o período de triagem de amostras foi de 1º de janeiro a 15 de agosto de 2000.

Foram separadas alíquotas de líquido cefalorraquiano com 600 microlitros e armazenadas em freezer sob temperatura de -20°C . Não foi utilizado inibidor de protease nas amostras congeladas. Foram desprezadas as amostras com presença de sangue, xantocromia ou com quantidade insuficiente de líquido cefalorraquiano para realização de todos os testes. Os testes ELISA e IFI foram realizados com os antígenos de *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* ao mesmo tempo, com os mesmos equipamentos e reagentes.

Para complementação das informações clínicas de cada paciente analisou-se:

- prontuários médicos;
- resultados de tomografia axial computadorizada de crânio para classificação de caso e caracterização clínica e,
- ficha de notificação e tratamento de foco de teniose e cisticercose humana.

4.1.2. Grupo de Estudo

Foram selecionadas 39 (trinta e nove) amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com diagnóstico compatível com neurocisticercose. Para confirmação do diagnóstico foram estudados os laudos dos exames por imagem (tomografia axial computadorizada) de cada paciente. O diagnóstico por imagem ficou estabelecido como padrão ouro. Quando analisou-se os indicadores dos antígenos de *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* com a finalidade de compará-los utilizou-se como padrão ouro apenas o diagnóstico de neuroimagem. Todas as amostras de pacientes foram classificadas como diagnóstico provável (ANEXO 1). Quando analisou-se isoladamente os indicadores para o antígeno de *Cysticercus longicollis* o padrão ouro utilizado para classificação de neurocisticercose foi o de neuroimagem associado com a positividade em pelo menos uma reação imunológica em líquido cefalorraquiano (IFI e/ou ELISA). Nessas reações imunológicas utilizou-se antígeno homólogo e todas as amostras foram classificadas com o diagnóstico definitivo para neurocisticercose humana segundo critério de DEL BRUTO (1996, p. 1-6). (ANEXO 1).

As amostras de pacientes com diagnóstico comprovado de neurocisticercose foram separadas em dois grupos de acordo com as formas de apresentação da doença:

- amostras de pacientes com cistos vivos, vivos e em degeneração, vivos e degenerados.
- amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com cistos degenerados (calcificados).

Para separação dos casos do grupo de estudo com cistos vivos e/ou degenerados do grupo de estudo com cistos calcificados, utilizou-se a metodologia descrita por SOTELO; GUERRERO e RUBIO (1985, p. 442).

O período de intervalo entre as colheitas de amostras de líquido cefalorraquiano foi de 25 meses e não influenciou nos resultados dos testes, quanto a presença de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* da classe IgG. As punções líquóricas foram todas lombares.

Vinte e uma amostras de líquido cefalorraquiano compuseram o grupo de indivíduos com cisticercos em atividade (cistos vivos e/ou em degeneração), sendo 12 (57,14%) de indivíduos do sexo masculino e 09 (42,85%) do sexo feminino. A média de idade entre estes pacientes foi de 41,8 anos, variando de 27 a 76 anos.

Entre os pacientes com cistos calcificados 08 (44,44%) eram do sexo masculino e 10 (55,55%) do sexo feminino, de um total de 18. A média de idade entre estes indivíduos foi de 43,3 anos, variando de 17 a 71 anos.

Ao somar-se as amostras de indivíduos com as duas formas de cisticercos o número total foi de 39 sendo 20 (51,28%) do sexo masculino e 19 (48,72%) do sexo feminino. A média de idade foi de 42,5 anos por paciente variando de 17 a 76 anos (ANEXO 4, QUADROS 9 e 10).

4.1.3. Grupo Controle

O grupo controle foi formado por 51 amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes tendo como critério de seleção exames de neuroimagem negativos para neurocisticercose (ausência de cisto vivo, degenerado ou calcificado).

As características clínicas e identificação dos pacientes do grupo controle foram confirmadas através do estudo dos prontuários médicos (ANEXO 4, TABELA 16).

Entre as 51 amostras de líquido cefalorraquiano 35 (68,63%) eram de pacientes do sexo masculino e 16 (31,37%) do sexo feminino, perfazendo uma média de idade de 37,5 anos, variando de 14 a 70 anos (ANEXO 4, QUADRO 11).

As amostras de líquido cefalorraquiano dos pacientes do grupo controle foram processadas e armazenadas da mesma forma que para as amostras de pacientes do grupo de estudo.

4.1.4. Caracterização de Grupos

Sexo

Na comparação entre os grupos de pacientes com cistos em atividade e calcificados, não foi constatado diferença significativa em relação ao sexo (TABELA 1).

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DO SEXO DOS PACIENTES COM CISTOS EM ATIVIDADE E CALCIFICAÇÕES. CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000

SEXO	CISTOS EM ATIVIDADE		CALCIFICAÇÕES		TOTAL	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Masculino	12	57,1	08	44,4	20	51,3
Feminino	09	42,9	10	55,6	19	48,7
TOTAL	21	100,0	18	100,0	39	100,0

$$\chi^2_{\text{calc}} = 0,22 ; p = 0,6386.$$

Também não foi constatada diferença significativa quando comparados os grupos em estudo com o grupo controle (TABELA 2).

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO SEXO DOS PACIENTES COM CISTO E DO GRUPO CONTROLE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

SEXO	COM CISTO		CONTROLE		TOTAL	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Masculino	20	51,3	35	68,6	55	61,1
Feminino	19	48,7	16	31,4	35	38,9
TOTAL	39	100,0	51	100,0	90	100,0

Com Cisto x Controle $\rightarrow \chi^2_{\text{calc}} = 2,12$ e $p = 0,1458$; Em Atividade x Controle $\rightarrow \chi^2_{\text{calc}} = 0,43$ e $p = 0,5105$; Calcificados x Controle $\rightarrow \chi^2_{\text{calc}} = 2,36$ e $p = 0,1242$.

Idade

A idade média dos pacientes com cisto foi de $42,5 \pm 14,5$ anos (mediana de 39,0 anos) e do grupo controle foi de $37,5 \pm 13,2$ anos (mediana de 38,0), não sendo constatado diferença significativa. Também comparou-se os subgrupos de pacientes com cistos, não sendo constatada diferença estatística (QUADRO 1).

QUADRO 1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA IDADE DOS PACIENTES COM CISTO E DO GRUPO CONTROLE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

IDADE	N.º	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
COM CISTO	39	42,5	⁽¹⁾ 14,5	17,0	76,0	39,0
• Em Atividade	21	41,8	⁽¹⁾ 14,7	25,0	76,0	38,0
• Calcificados	18	43,3	⁽¹⁾ 14,5	17,0	71,0	43,0
CONTROLE	51	37,5	⁽¹⁾ 13,2	14,0	70,0	38,0
TOTAL GERAL	90	39,7	⁽¹⁾ 13,9	14,0	76,0	38,0

(1) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

Em Atividade x Calcificados → $z=0,705$ e $p=0,481$; Em Atividade x Controle → $z=0,595$ e $p=0,552$; Calcificados x Controle → $z=1,484$ e $p=0,138$; Com Cisto x Controle → $z=1,279$ e $p=0,201$.

4.2. MÉTODO

4.2.1. Componentes Biológicos para Preparação de Antígenos

a) *Taenia solium* - *Cysticercus cellulosae*

Utilizou-se cisticercos de suínos naturalmente infectados. As carcaças foram identificadas pela inspeção veterinária, separadas e congeladas sob temperatura de -20°C . Posteriormente 50 kg de tecido muscular suíno foram descongelados e os cisticercos dissecados (FIGURA 5). No total 1578 cisticercos foram utilizados para produção de um lote de antígeno, sendo 780 parasitas para IFI e 798 para ELISA (PIALARISSI; VAZ; SOUZA, 1987, p. 369).

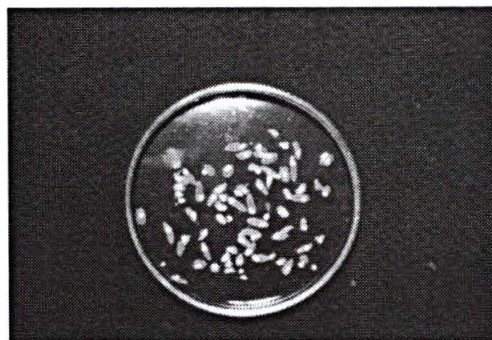


FIGURA 5. *Cysticercus cellulosae* extraídos de tecido muscular de suíno infectado naturalmente.

b) *Taenia crassiceps* - *Cysticercus longicollis*

Para preparação dos antígenos de *Cysticercus longicollis* foi utilizada a cepa ORF (FREEMAN, 1962, p. 969). Para o presente trabalho a cepa foi inoculada intraperitonealmente, em camundongos da raça Swiss, sexo feminino. As inoculações se processaram com intervalos de 90 dias, repetindo-se o processo de inoculação por sucessivas vezes, visando a manutenção da cepa (VAZ, 1993, p. 21).

Os parasitos em número aproximado de 300 por animal, foram removidos 90 dias depois da inoculação, lavados por sucessivas vezes em salina e mantidos em PBS na temperatura de -20°C . Após a eliminação das formas calcificadas e degeneradas o material foi processado para produção dos extratos antigênicos (FIGURA 6).

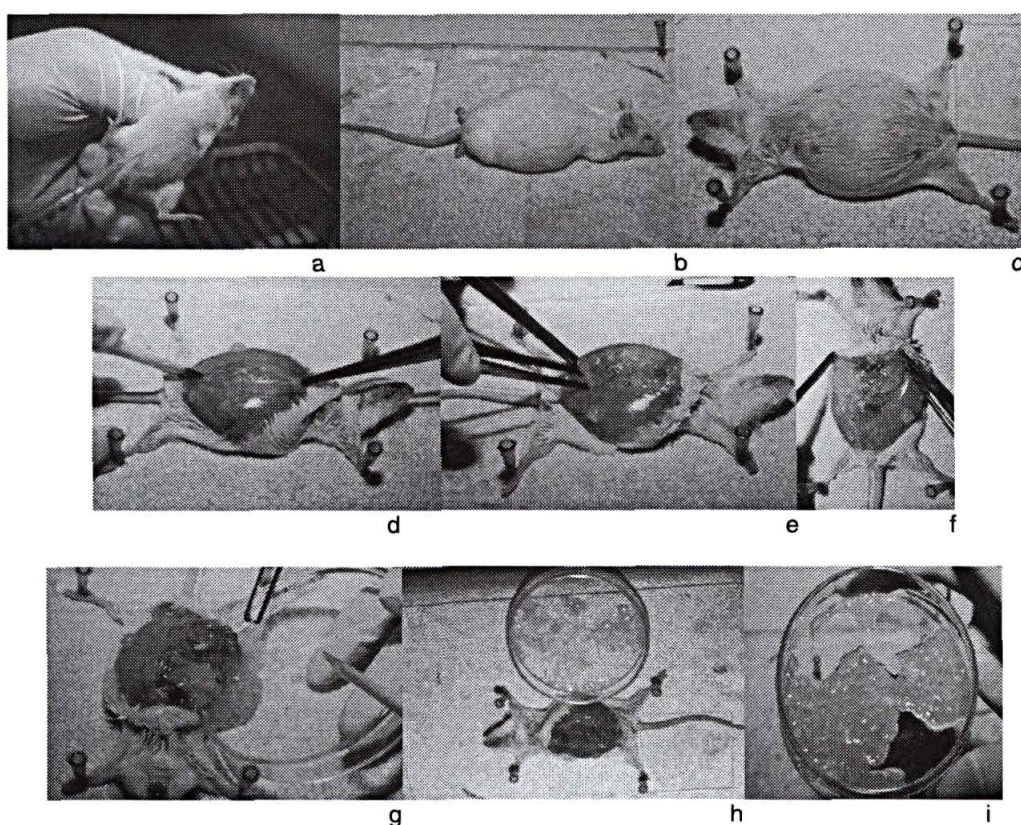


FIGURA 6. a) inoculação intraperitoneal de *Cysticercus longicollis* em camundongo do sexo feminino da raça Swiss. b) camundongo 90 dias após inoculação apresentando abdômen repleto. c) camundongo imobilizado após eutanásia. d - h) incisão abdominal até extração dos cisticercos. i) placa com cerca de 300 cisticercos imediatamente após laparotomia.

4.2.2. Produção de Antígenos para Imunodiagnóstico da Neurocisticercose Humana

a) *Cysticercus cellulosae* para Imunofluorescência Indireta

A produção do antígeno consistiu na extração de cisticercos de tecido muscular de suínos infectados naturalmente. O tecido muscular suíno foi submetido a descongelamento e efetuada a retirada das vesículas de *Cysticercus cellulosae* tomando-se o cuidado de retirá-las íntegras excluída a membrana adventícia, resultante da reação inflamatória do hospedeiro (FIGURA 7). Foram efetuadas as seguintes etapas para preparação do antígeno (PIALARISSI; VAZ; SOUZA, 1987, p. 369) :

- lavagem dos cisticercos em solução de NaCl 0,85% por 10 vezes;
- após nova lavagem dos cisticercos em solução de salina a 0,15 M procedeu-se a retirada das membranas parasitárias componentes das vesículas císticas, trabalhando-se em placa de Petri, com auxílio de pinça anatômica e bisturi. As estruturas foram colocadas em placas de Petri, cerca de 100 por placa para dessecação. As placas ficaram em processo de dessecação por aproximadamente 60 dias a -20°C. Para retirada do ar do dessecador acoplou-se bomba aspiradora por cinco minutos sob pressão negativa de 40 cm de Hg;
- para execução da fase final de produção do antígeno procedeu-se o descongelamento do material que estava acondicionados nas placas e completamente dessecados;
- seqüencialmente realizou-se a raspagem das placas para retirada do material;
- posteriormente foi realizada a trituração com gral e pistilo, lavagem dos fragmentos, centrifugações repetidas a 3.000 rpm com álcool etílico e a 3.000 rpm com éter etílico, nova dessecação. Ressuspendeu-se os sedimentos em PBS pH 7,2 e incubou-se a 37°C durante 18 horas com agitação;
- procedeu-se nova centrifugação (3.000 rpm) a 4°C, e nova ressuspensão em PBS pH 7,2 com água destilada com 0,5% de soro. Verificou-se o número de partículas e fluorescência. Posteriormente realizou-se o envase e liofilização.

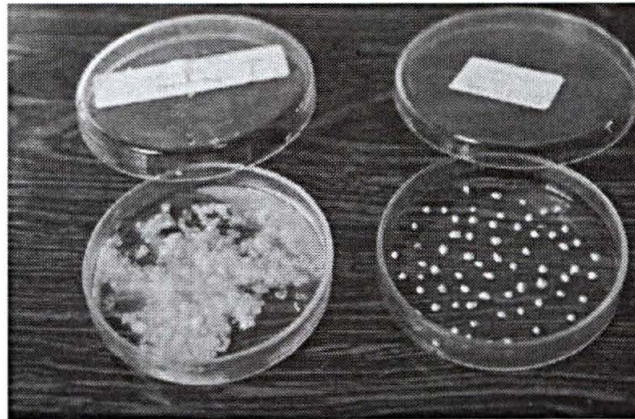


FIGURA 7. Placas com cisticercos após dessecação com *Cysticercus longicollis* (esquerda) e *Cysticercus cellulosae* (direita).

b) *Cysticercus longicollis* para Imunofluorescência Indireta

Os camundongos inoculados por via intraperitoneal com *Cysticercus longicollis*, foram submetidos a laparotomia para a retirada dos cisticercos, 90 dias após a inoculação (VAZ; NAKAMURA; BARRETO, 1987, p. 160). Foram realizadas as seguintes etapas para preparação do antígeno:

- os cistos eram retirados do abdômen dos camundongos e colocados em placas de Petri, lavados em água destilada e solução de NaCl (0,85%). Foram congelados a -20°C e submetidos a dessecação;
- para o preparo do antígeno as placas contendo os cisticercos eram retiradas do freezer uma hora antes do início da produção;
- colocou-se cerca de 200 cisticercos em gral. Os cistos, na placa de Petri, eram colocados em recipiente contendo gelo. Os cistos eram triturados suavemente com auxílio de bastão de vidro;
- acrescentou-se aos poucos metade do volume de água destilada estéril, gelada, a ser utilizada na homogeneização (para cada 200 cisticercos - 20 ml de água destilada gelada);
- transferiu-se, aos poucos, as vesículas trituradas no gral, para o tubo homogeneizador de tecidos, mantendo-se sempre o tubo em gelo. Após homogeneizar, utilizou-se o volume total da água destilada, colocou-se o material homogeneizado em becker (250 ml);

- colocou-se o becker no agitador magnético por 18 horas sob temperatura de 4°C;
- para envase do antígeno homogeneizou-se bem o frasco, contendo as partículas menores da suspensão do antígeno. Com auxílio de pipeta automática de 10 ml, procedeu-se o envase, na quantidade de 1 ml para cada frasco. Arrolhou-se com tampa de borracha;
- foi separada amostra para teste de imunofluorescência visando a verificação do número e tamanho de partículas, bem como, sua fluorescência, para posterior liofilização.

c) *Cysticercus cellulosae* para Teste Imunoenzimático

O antígeno foi preparado com cisticercos extraídos de tecido muscular de suínos, dessecados e conservados a -20°C (PIALARISSI; VAZ; SOUZA, 1987, p. 369). Procedeu-se a execução das seguintes operações:

- extração e dessecação dos cisticercos;
- trituração dos cisticercos com gral e pistilo;
- sonicação e isotonização do antígeno a granel,
- após agitação durante 18 horas, lavou-se o antígeno com água destilada gelada;
- procedeu-se o controle de qualidade físico-químico dosando-se as proteínas do antígeno pelo método de BRADFORD (1976, p. 242);
- com resultado satisfatório procedeu-se o envase e liofilização.

d) *Cysticercus longicollis* para Teste Imunoenzimático

O antígeno foi preparado a partir de líquido vesicular e proteínas solúveis de membrana de cisticercos (VAZ, 1993, p. 31).

Foram realizadas as seguintes etapas para preparação do extrato antigênico:

- os cistos eram colocados em placas de Petri, lavados em água destilada e solução fisiológica de NaCl (0,85%),
- procedeu-se a trituração dos cisticercos em gral, com auxílio de um bastão de vidro,

- separou-se o sedimento do sobrenadante em centrífuga refrigerada por 60 minutos, a 4°C, a 8.000 rpm;
- separou-se o sobrenadante (líquido vesicular + proteínas solúveis da membrana parasitária);
- procedeu-se controle de qualidade físico-químico, dosando-se as proteínas do antígeno pelo método de BRADFORD (1976, p. 242);
- após a obtenção de resultado satisfatório procedeu-se o envase e liofilização do antígeno.

Os resultados apresentados basearam-se nos exames imunológicos de líquido cefalorraquiano pelos métodos de imunofluorescência indireta e imunoenzimático, obtidos a partir de dois antígenos, em amostras de indivíduos dos grupos de estudo e controle. Os referidos métodos foram expressos em títulos e densidades ópticas para imunofluorescência indireta e enzimoimunoensaio, respectivamente.

4.2.3. Pesquisa de Anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* no Líquido Cefalorraquiano

A pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* foi realizada em todas as amostras dos grupos de estudo e de controle pelos métodos de imunofluorescência indireta e enzimoimunoensaio, utilizando antígenos homólogo e heterólogo (PIALARISSI; VAZ; SOUZA, 1987, p. 369).

a) Teste de Imunofluorescência Indireta para Pesquisa de Anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae*

Foram realizadas as seguintes etapas na preparação da técnica de IFI:

- utilizou-se lâmina com fileira tripla dividida oito vezes para microscopia;
- as lâminas foram mergulhadas em álcool 96°GL, por 24 horas, visando a remoção de sujidades e congeladas a -20°C.
- secou-se as lâminas em estufa à 37°C por 24 horas;
- diluiu-se os antígenos liofilizados para imunofluorescência indireta com água destilada;

- aplicou-se 20 μ l de antígeno no centro de cada delimitação da lâmina com o auxílio de micropipeta;
- depois de aplicado todo antígeno as lâminas foram levadas à estufa a 37°C por 30 minutos para fixação do antígeno (FIGURA 8);
- as lâminas foram embrulhadas uma a uma com papel manteiga tomando-se o cuidado de não encostar uma na outra;
- cada grupo de cinco lâminas identificado foi embrulhado com papel alumínio e a conservação a -20°C até o momento da realização da prova;
- utilizou-se no teste, conjugado anti-IgG humana ligado a fluoresceína na titulação de 1/250. Os testes foram realizados com amostras de líquido cefalorraquiano controles positivos e negativos (líquores de referência).
- as diluições sucessivas das amostras de líquido cefalorraquiano em solução de PBS para IFI foram de 1/1 (líquido cefalorraquiano puro) e sucessivas a partir de 1/5 até 1/320. (QUADRO 2).

QUADRO 2 - DILUIÇÕES DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO EM PBS PARA TESTE DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

	1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
PBS	0	0,4	0,9	0,19	0,39	0,79	0,159	0,319
LCR	0,05	0,1	0,1	0,01	0,01	0,01	0,001	0,001

- procedeu-se a leitura das lâminas em microscópio de imunofluorescência das amostras de líquido cefalorraquiano, que estão apresentados no capítulo de Resultados (FIGURA 9).



FIGURA 8. Lâminas para teste de imunofluorescência indireta em processo de incubação.

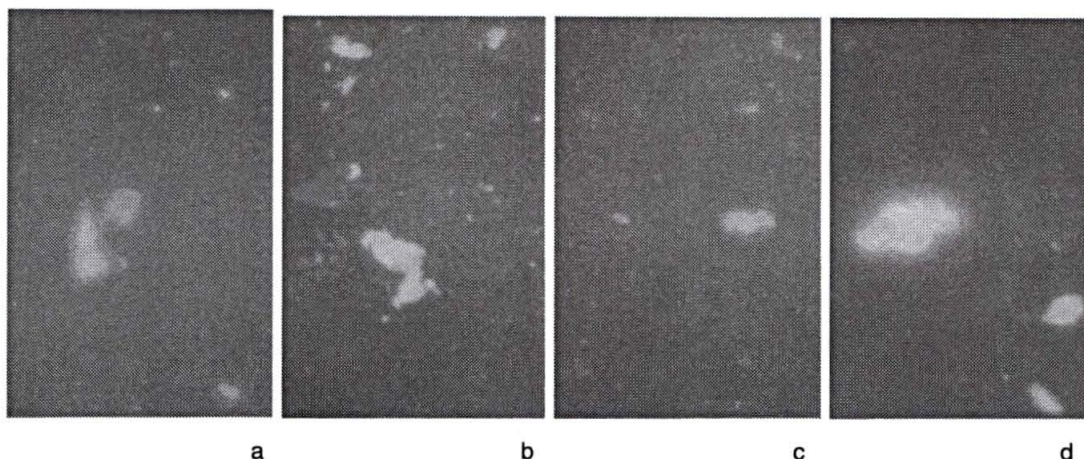


FIGURA 9. Resultado do teste de imunofluorescência indireta com LCR de pacientes portadores ou não de neurocisticercose. Microscópio de imunofluorescência. a) não reagente com *C. cellulosae*. b) reagente 1/5 com *C. cellulosae*. c) não reagente com *C. longicollis*. d) reagente 1/5 com *C. longicollis*. Aumento de 400 vezes.

b) Teste ELISA (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*) para Pesquisa de Anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae*

Para determinação da concentração do antígeno *Cysticercus cellulosae* por orifício visando a realização do teste imunoenzimático, efetuou-se reação em bloco utilizando-se seis concentrações de antígeno (05 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml e 40 µg/ml frente a 11 diluições de líquido cefalorraquiano (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 e 1/1024).

Foram utilizadas também amostras de líquido cefalorraquiano controle negativo e branco. Pela reação em bloco determinou-se que a concentração é de 10 µg/ml.

Os procedimentos descritos, foram também realizados para o antígeno *Cysticercus longicollis*. Pela reação em bloco determinou-se que a concentração de antígeno é de 10 µg/ml.

Para proceder a sensibilização das placas preparou-se solução tampão de carbonato – bicarbonato pH 9,6 (0,5M) utilizando a seguinte fórmula:

Na ₂ CO ₃	→	0,318g
NaHCO ₃	→	0,586g
Acertou-se o pH para	→	9,6
H ₂ O destilada	→	200ml

- armazenou-se a solução preparada sob temperatura de 4°C,
- diluiu-se o antígeno liofilizado de *Cysticercus cellulosae* em 01 ml de água destilada e este em 35 ml de tampão carbonato – bicarbonato.
- para sensibilização da placa com antígeno de *Cysticercus longicollis* para o teste imunoenzimático, diluiu-se o conteúdo do frasco de antígeno em 1ml de água destilada. A esse volume acrescentou-se 129 ml de solução tampão carbonato – bicarbonato.
- distribuiu-se 100µl da solução antigênica nos orifícios da microplaca de orifícios com fundo chato para sensibilizá-la,
- incubou-se por duas horas a temperatura ambiente e, na seqüência por 18 horas a 4°C tampada,
- lavou-se a microplaca com tampão de lavagem 6 vezes em lavadora automática ,
- preparou-se o tampão de lavagem usando a seguinte fórmula:

Na CL	→	8,5g
H ₂ O destilada	→	1.000ml
Tween 20	→	0,5ml

- esta solução foi armazenada em geladeira até seu uso. Inverteu-se a placa sobre um papel absorvente para retirar o excesso de umidade. A placa já sensibilizada foi mantida em freezer a -20°C.

Para realização do teste imunoenzimático foram processadas as seguintes etapas:

- colocou-se 100 µl de tampão de diluição nas demarcações A1 e A2 da microplaca para estabelecer o branco da reação;
- 100 µl de líquidos puros (1/1) a serem estudados, foram colocados nos demais orifícios da microplaca já adsorvida com os antígenos de *Cysticercus cellulosae* ou de *Cysticercus longicollis*;
- nas últimas demarcações das placas foram colocados os controles negativos e controles positivos (líquores de referência);
- cobriu-se a placa com papel adesivo e agitou-se à mão;

- colocou-se a microplaca na incubadora por 60 minutos a 37° C;
- lavou-se seis vezes a microplaca em lavadora automática utilizando-se solução tampão de lavagem;
- ao final, o líquido dos orifícios foi retirado invertendo-se a placa;
- adicionou-se 100 µl do conjugado anti-IgG humana ligada com peroxidase, diluindo-o em solução tampão; repetiu-se os processos de incubação e lavagens;
- pesou-se em balança de precisão 10 mg de OPD e dilui-se em 10 ml de solução tampão de citrato fosfato 0,2M pH 5,0, seguindo-se da adição de 10 µl de água oxigenada a 30%;
- o reagente foi preparado em frasco âmbar sem exposição à ação luz;
- adicionou-se 100 µl de substrato OPD (o-Phenyldiamine. 2HCl);
- incubou-se a placa por 10 minutos a 37° C no escuro;
- interrompeu-se a reação pela adição de 20 µl de bloqueador (solução de ácido sulfúrico 4N);
- procedeu-se a leitura da densidade óptica no leitor de microplaca utilizando-se um filtro com comprimento de onda de 492 nm (peroxidase);
- fez-se a média da densidade óptica dos brancos situados nas posições A1 e A2 e descontou-se de todas as leituras este valor. Obteve-se, então, as densidades ópticas de cada amostra. (ANEXOS 4, QUADROS 8, 9 e 10).

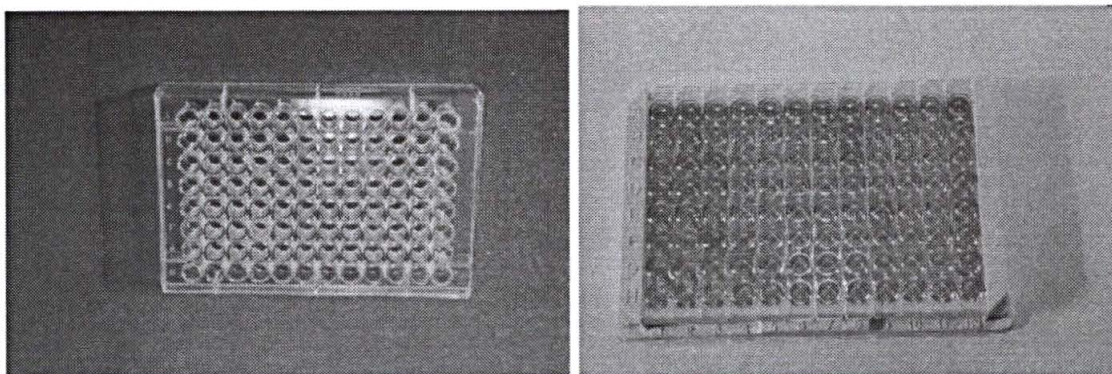


FIGURA 10. Teste ELISA. a) microplaca sensibilizada com antígeno. b) microplaca após reação imunoenzimática visualizando-se orifícios com alteração cromática.

c) Titulação do Conjugado anti-IgG Humana ligada com fluoresceína para Teste de Imunofluorescência Indireta

A titulação do conjugado para reação de imunofluorescência indireta, visou encontrar a diluição de escolha do conjugado anti-IgG humana ligada com fluoresceína. Escolheu-se a diluição do conjugado que forneceu o título esperado para o líquido cefalorraquiano padrão positivo utilizado.

Para proceder a titulação do conjugado procedeu-se as seguintes operações:

- preparação da câmara úmida com placa de petri grande, palitos de madeira, esparadrapo, gaze umedecida com PBS (solução salina fosfatada tamponada pH 7,2 a 7,4);
- preparação de glicerina tamponada (solução de tampão glicerina com carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,6) com a finalidade de bloquear a reação na etapa final;
- separação do antígeno liofilizado de *Cysticercus cellulosae* ou *Cysticercus longicollis* liofilizado;
- preparação de solução de Tween 80 a 2% em solução de PBS com azul de Evans. A solução foi utilizada para diluir o conjugado e maximizar a sua fluorescência;
- seleção de uma amostra de líquido cefalorraquiano comprovadamente positivo para cisticercose humana e de título conhecido;

O procedimento para titulação consistiu nas seguintes etapas:

- elaboração do protocolo de titulação do conjugado anti IgG humana, utilizando líquido cefalorraquiano positivo e de título conhecido;
- diluiu-se os antígenos liofilizados para imunofluorescência indireta com água destilada;
- aplicou-se 20 µl de antígeno no centro de cada delimitação da lâmina com o auxílio de micropipeta;
- depois de aplicado todo antígeno as lâminas foram levadas à estufa a 37°C por 30 minutos para fixação do antígeno;
- as lâminas foram embrulhadas uma a uma com papel manteiga tomando-se o cuidado de não encostar uma na outra;
- cada grupo de cinco lâminas foi identificado, embalado em papel alumínio e conservado sob temperatura de -20°C até o momento da realização da prova;

- em uma das lâminas foi aplicado conjugado de título já conhecido, que serviu de padrão. O título deste conjugado era 1/300;
- procedeu-se então a incubação das lâminas a 37°C por 30 minutos;
- lavou-se com PBS, por três vezes e uma vez com água destilada, secou-se a 37°C;
- aplicou-se sobre todas as lâminas solução de glicerina tamponada pH 9,6 para interromper a reação e cobriu-se as lâminas com lamínulas;
- As lâminas foram levadas ao microscópio para imunofluorescência em sala escura e com aumento de 400 vezes iniciou-se a leitura. Considerou-se para escolha a titulação do conjugado cuja fluorescência foi igual à leitura do padrão.

d) Titulação do Conjugado anti-IgG Humana ligada com Peroxidase para Teste Imunoenzimático

Para titular o conjugado anti-IgG humana, ligada com peroxidase para técnica de ELISA, procedeu-se as seguintes operações:

- preparou-se solução tampão com solução de salina fosfatada (PBS) com Tween 20 e gelatina para diluições de líquido cefalorraquiano,
- selecionou-se duas microplacas sensibilizadas com antígenos de *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*,
- selecionou-se uma amostra de líquido cefalorraquiano positiva para cisticercose com título conhecido. Foram aplicados na placa a quantidade de 100 µl do líquido cefalorraquiano de título conhecido, mais 100 µl de solução tampão em várias diluições : 1/1 (LCR puro), 1/2 , 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 (QUADRO 5).

QUADRO 5 - DILUIÇÃO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO PARA TITULAÇÃO DO CONJUGADO ANTI-IgG HUMANA, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

TUBO	1	2	3	4	5	6
LCR	100 µl	100 µl →	100 µl →	100 µl →	100 µl →	100 µl
Tampão de diluição	0	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Diluição	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32

- na linha "A" onde consta a letra B aplicou-se 100 µl de tampão de diluição cujas densidades ópticas serviram para cálculo do branco da reação; a seguir aplicou-se na linha "H" da microplaca amostra de líquido cefalorraquiano controle negativo para cisticercose (CN) puro (1/1) (QUADRO 6).

QUADRO 6 - ESQUEMA COM ORIFÍCIOS DA MICROPLACA PARA TESTE IMUNOENZIMÁTICO INDICANDO OS PONTOS DE COLOCAÇÃO DOS CONTROLES NEGATIVOS E BRANCOS DA REAÇÃO, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
C	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	½	1/2	1/2	1/2
D	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	¼	1/4	1/4	1/4
E	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
F	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
G	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32
H	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN

- procedeu-se as etapas para realização do teste imunoenzimático: incubação por 60 minutos a 37°C, seis lavagens em lavadora automática (30 segundos de intervalo entre cada lavagem), inverteu-se as placas para retirada do excesso de líquido;
- aplicou-se o conjugado a titular, na microplaca, da seguinte forma:
 - Fileira 1: 100 µl do conjugado anti-IgG humana ligada com peroxidase de título conhecido, diluído em seu título com tampão de diluição;
 - Fileira 2: 100 µl do conjugado que se estava titulando diluído a 1:1.000 (10 µl do conjugado e 10 ml de tampão de diluição),
 - Fileiras 3 a 12: aplicou-se sempre 100 µl do conjugado a titular diluído progressivamente a 1:1.500; 1:2.000; 1:2.500; 1:3.000; 1:3.500; 1:4.000; 1:4.500; 1:5.000; 1:5.500 e 1:6.000;
- procedeu-se novamente incubação por 60 minutos a 37°C, seis lavagens em lavadora automática (30 segundos de intervalo entre cada lavagem) e inversão das placas para retirada do excesso de líquido;
- aplicou-se 100 µl do substrato (OPD) diluído em tampão de substrato (10 mg de OPD + 10 ml de solução de citrato-fosfato 0,2M

pH 5,0 + 10 µL de água oxigenada a 30 %), incubou-se 10 minutos ao abrigo da luz em temperatura de 37°C;

- para interromper a reação aplicou-se 20 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em cada orifício;
- foi procedida a leitura automática no leitor de placa de ELISA com filtro de 492 nm, nos dez minutos seguintes, para evitar a degradação da coloração no final da reação;
- de posse das densidades ópticas obtidas para cada orifício, descontou-se a leitura da densidade óptica da linha "B", do branco da reação. Obteve-se, então a densidade óptica real. Considerou-se o título ideal aquele cuja densidade óptica do líquido cefalorraquiano foi a mais próxima do conjugado de título conhecido.

e) Cálculo do Ponto de Corte do Teste Imunoenzimático para Diagnóstico da Cisticercose

Para o cálculo do ponto de corte da reação foram realizadas as seguintes operações:

- foram separadas 30 amostras de líquido cefalorraquiano, comprovadamente negativas para cisticercose e aplicadas de forma pura (diluição 1/1) na microplaca;
- para o teste imunoenzimático foram utilizadas três microplacas sensibilizadas previamente, conservadas a -20°C;
- as microplacas ficaram em temperatura ambiente até o completo descongelamento;
- reservou-se os dois primeiros orifícios para o branco (A1 e A2) onde colocou-se 100 µl de tampão de diluição;
- colocou-se a partir do orifício A3 100 µl de cada amostra de líquido cefalorraquiano em seqüência. Nos orifícios A1 e A2 colocou-se 100 µl do tampão de diluição, para cálculo do branco;
- no último poço da microplaca aplicou-se amostra de líquido cefalorraquiano controle positivo. As amostras não foram examinadas em duplicata;
- foi procedido o teste imunoenzimático para cisticercose humana;

- com os resultados do teste imunoenzimático concluído somou-se as densidades ópticas dos orifícios A1 e A2 (branco) da placa e dividiu-se por 2 que foi a média do branco;
- descontou-se o valor do branco das densidades ópticas de todas as amostras que foi a densidade óptica real das amostras;
- somou-se todas as densidades ópticas da placa dividindo-as por 30 para obter a média da densidade óptica. Foi excluída da soma a densidade óptica do controle positivo pois este foi testado para verificar se a reação aconteceu;
- calculou-se o desvio padrão da reação utilizando a seguinte fórmula (SPIEGEL,1976, p. 111):

$$s = \sqrt{\frac{\sum[(\varpi_2 - \varpi)^2]}{n}}$$

Σ = somatória

ϖ_2 = densidade óptica de cada paciente

ϖ = média das densidades ópticas

n = número de amostras.

O ponto de corte foi a média das densidades ópticas acrescido duas vezes do desvio padrão (s)

4.3 MÉTODO ESTATÍSTICO

4.3.1. Matriz para Cálculo de Indicadores de Sensibilidade e Especificidade

Para cálculo dos coeficientes para avaliação comparativa e epidemiológica dos testes diagnóstico as fórmulas utilizadas basearam-se no modelo para avaliação de um teste diagnóstico e matriz para os cálculos. (PEREIRA, 1995, p. 369).

Matriz para Cálculo de Indicadores

TESTE	DOENTES	SADIOS	TOTAL
Positivo	Verdadeiro Positivo (a)	Falso-Positivo (b)	a + b
Negativo	Falso-Negativo (c)	Verdadeiro Negativo (d)	c + d
TOTAL	a + c	b + d	N

$$\begin{aligned}
 N = \text{número total de examinados} &= a + b + c + d \\
 \text{Sensibilidade} &= a / a + c \\
 \text{Especificidade} &= d / b + d \\
 \text{Valor preditivo positivo} &= a / a + b \\
 \text{Valor preditivo negativo} &= d / c + d \\
 \text{Índice de Youden} &= (a / a + c) + (d / b + d) - 1
 \end{aligned}$$

Nota: Indicadores expressos em percentagem.

O Índice de Youden traduz a eficácia diagnóstica do teste e tem como valor máximo 1 (Glossário).

Para o estudo comparativo dos testes imunológicos foram analisados os índices estatísticos e aplicado o teste não-paramétrico “Mann-Whitney” para amostras independentes, através do *software* “Primer of Biostatistics”, Glantz (1997, “software”) e para a comparação do sexo, foi utilizado o teste não-paramétrico Qui-Quadrado com correção de Yates, obtido pelo *software* “Epi-Info” (Dean, 1997, “software”).

A média geométrica dos títulos foi calculada com os títulos codificados pela fórmula $\log_2(2n/2)$. Em relação à análise das sensibilidades foi aplicado o Teste de Cochran, não-paramétrico. (PAUL; WHITE, 1973, “software”).

Para aplicação dos testes demonstrou-se que os dois grupos são análogos, com relação a idade e ao sexo dos pacientes. As demais características dos pacientes constam do ANEXO 4.

5. RESULTADOS

5.1. RENDIMENTOS DA PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS

O tecido muscular suíno foi dissecado para se obter 780 parasitas para produção do antígeno de IFI e 798 cisticercos para o antígeno destinado ao teste imunoenzimático

Para o antígeno de *Cysticercus longicollis* obteve-se a cada repique em torno de 300 vesículas por camundongo.

O volume produzido do antígeno de *Cysticercus cellulosae* para imunofluorescência indireta foi de 45 ml. A quantidade de partículas antes da liofilização foi de quatro por campo em microscópio óptico no aumento de 400 vezes. Após liofilização sob observação em microscópio de imunofluorescência o número de partículas, por campo, foi de 10 a 20.

O volume produzido do antígeno de *Cysticercus cellulosae* para ELISA foi de 192 ml de antígeno não liofilizado, cuja concentração protéica foi de 0,40 mg/ml. Após a liofilização a concentração protéica por frasco foi de 0,36 mg/ml. A umidade residual do antígeno liofilizado foi de 4,78%.

O volume produzido do antígeno *Cysticercus longicollis* para imunofluorescência indireta foi de 44 ml de antígeno, posteriormente liofilizado. Foram contados cerca de 30 a 50 fragmentos, por campo, em aumento de 400 vezes. Após liofilização e visualização no microscópio de imunofluorescência, no aumento de 400 vezes, foram contados 10 a 20 fragmentos por campo.

O volume produzido do antígeno de *Cysticercus longicollis* para teste imunoenzimático foi de 49 ml de antígeno, posteriormente liofilizado, com concentração protéica de 1,3 mg/ml.

5.2. PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS

IFI

Titulação do Conjugado para Teste de Imunofluorescência Indireta

No presente trabalho três diluições de conjugado foram usadas e a que mais se aproximou da leitura do conjugado padrão foi a de 1/250. A partir disto todas as análises foram realizadas com esta diluição para ambos antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*.

Titulação do Líquido Cefalorraquiano para Teste de Imunofluorescência Indireta

Para os testes de imunofluorescência foi considerado positivo o líquido cefalorraquiano que apresentou reatividade a partir da diluição 1/1 (líquido cefalorraquiano puro). Para cada paciente apresentando título positivo várias diluições foram feitas e o título considerado positivo foi aquele que apresentou reatância na maior diluição. Os resultados de cada amostra estudada estão no ANEXO 4.

ELISA

Titulação do Líquido Cefalorraquiano para Teste Imunoenzimático

Onze diluições de líquido cefalorraquiano (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 e 1/1024), pertencendo a controles positivos e controles negativos foram testadas. Frente aos resultados obtidos os demais exames foram realizados com diluições de 1/1 (líquido cefalorraquiano puro).

Cálculo do Ponto de Corte para Teste Imunoenzimático

Após a realização dos testes imunoenzimáticos com 30 amostras de líquido cefalorraquiano para ambos antígenos foram considerados reagentes para o teste imunoenzimático amostras de indivíduos que apresentaram densidades ópticas iguais ou superiores a 0,210 e 0,306 para os antígenos de *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* respectivamente (ANEXO 4, QUADROS 9, 10 e 11)

Concentração dos Antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*

Pela reação em bloco determinou-se que a concentração é de 10 µg/ml para os dois antígenos.

Ao adicionar-se 100 µl da solução antigênica cada orifício recebeu 01 µg de antígeno.

Titulação do Conjugado para Teste Imunoenzimático

A diluição que mais se aproximou da densidade óptica do conjugado de valor conhecido foi 1:3.000 e que passou a ser aplicada nas microplacas para teste imunoenzimático.

Padronização do teste

O teste imunoenzimático ficou assim padronizado:

Concentração de antígeno	→ 01 µg /orifício
Titulação do LCR	→ 1/1
Diluição do Conjugado	→ 1:3000
Ponto de corte	→ <i>Cysticercus cellulosae</i> densidade óptica igual • 0,210
	→ <i>Cysticercus longicollis</i> densidade óptica igual • 0,306

5.3. RESULTADO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO COM ANTÍGENO HOMÓLOGO E HETERÓLOGO NOS PACIENTES COM DIAGNÓSTICO PROVÁVEL DE NEUROCISTICERCOSE

5.3.1. Grupo de Estudo

Do total de 39 amostras obtidas 21 (53,85%) eram provenientes de pacientes com cistos em atividade e 18 (46,15%) portadores de calcificações (QUADRO 7).

QUADRO 7 – RESULTADOS DOS TESTES DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO APLICADOS NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE INDIVÍDUOS COM NEUROCISTICERCOSE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

N.º	CISTOS EM ATIVIDADE					DIAGNÓSTICO	N.º	CISTOS CALCIFICADOS					DIAGNÓSTICO
	IFI Cc	IFI Cl	ELISA Cc	ELISA Cl				IFI Cc	IFI Cl	ELISA Cc	ELISA Cl		
1	1/10	1/10	0,706	0,929		Neurocisticercose	22	N/R	N/R	0,034	0,049	Neurocisticercose	
2	1/10	1/10	0,461	0,506		Neurocisticercose	23	1/80	1/80	1,819	1,826	Neurocisticercose	
3	1/10	1/5	0,618	0,363		Neurocisticercose	24	N/R	N/R	0,023	0,006	Neurocisticercose	
4	N/R	1/1	0,962	0,578		Neurocisticercose	25	N/R	N/R	0,013	0,032	Neurocisticercose	
5	1/80	1/40	1,526	1,488		Neurocisticercose	26	1/5	1/1	0,312	0,538	Neurocisticercose	
6	1/5	1/10	0,272	0,351		Neurocisticercose	27	N/R	N/R	0,037	0,015	Neurocisticercose	
7	N/R	N/R	0,539	0,883		Neurocisticercose	28	1/40	1/5	0,546	0,125	Neurocisticercose	
8	N/R	1/1	1,184	0,929		Neurocisticercose	29	1/20	1/40	1,562	1,457	Neurocisticercose	
9	1/1	1/10	1,155	1,141		Neurocisticercose	30	1/20	1/10	0,227	0,891	Neurocisticercose	
10	1/80	1/80	2,018	1,930		Neurocisticercose	31	1/1	1/5	1,737	1,063	Neurocisticercose	
11	1/5	1/1	1,816	0,954		Neurocisticercose	32	N/R	N/R	0,056	0,046	Neurocisticercose	
12	1/80	1/80	0,553	1,063		Neurocisticercose	33	1/10	1/1	0,449	0,141	Neurocisticercose	
13	1/5	1/1	1,275	0,435		Neurocisticercose	34	1/160	MI	0,994	1,204	Neurocisticercose	
14	1/10	1/1	1,561	1,170		Neurocisticercose	35	1/1	N/R	0,918	0,309	Neurocisticercose	
15	MI	1/1	0,298	1,699		Neurocisticercose	36	1/40	1/40	0,220	1,737	Neurocisticercose	
16	1/40	1/10	0,726	1,934		Neurocisticercose	37	1/5	1/1	0,942	0,162	Neurocisticercose	
17	1/40	1/20	0,799	1,879		Neurocisticercose	38	N/R	N/R	0,085	0,011	Neurocisticercose	
18	1/40	1/40	MI	1,567		Neurocisticercose	39	1/1	1/1	1,255	0,566	Neurocisticercose	
19	1/10	1/1	0,590	0,282		Neurocisticercose							
20	1/1	N/R	0,516	0,346		Neurocisticercose							
21	MI	N/R	0,885	0,486		Neurocisticercose							

Nota: MI: material insuficiente; N/R: não reagente; IFI expresso em títulos e ELISA em DO.

IFI Cc - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

IFI Cl - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus longicollis*;

Elisa Cc - teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

Elisa Cl - teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus longicollis*.

Das 19 amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com cistos em atividade que foi possível analisar no teste de imunofluorescência indireta, 16 (84,21%) foram reagentes com antígeno *Cysticercus cellulosae*. 21 amostras foram analisadas no mesmo teste com o antígeno *Cysticercus longicollis* sendo reagentes 18 (85,71%) (TABELA 3).

Das 18 amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com cistos calcificados analisadas no teste de imunofluorescência indireta, 12 (66,67%) foram reagentes com antígeno *Cysticercus cellulosae*. 17 amostras foram

analisadas no mesmo teste com o antígeno *Cysticercus longicollis* sendo reagentes 10 (58,82%) (TABELA 3).

TABELA 3 – RESULTADO DO TESTE IFI UTILIZANDO OS ANTÍGENOS *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* DOS PACIENTES COM CISTO, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

RESULTADO	<i>Cysticercus cellulosae</i>		<i>Cysticercus longicollis</i>	
	N.º	%	N.º	%
CISTOS EM ATIVIDADE	19	51,35	21	55,26
• Não Reagente	03	15,79	03	14,29
• Reagente	16	84,21	18	85,71
• 1 / 1	02	12,50	07	38,88
• 1 / 5	03	18,75	01	5,56
• 1 / 10	05	31,25	05	27,78
• 1 / 20	0	0	01	5,56
• 1 / 40	03	18,75	02	11,11
• 1 / 80	03	18,75	02	11,11
CISTOS CALCIFICADOS	18	48,65	17	44,74
• Não Reagente	06	33,33	07	41,18
• Reagente	12	66,67	10	58,82
• 1 / 1	03	25,00	04	40,00
• 1 / 5	02	16,67	02	20,00
• 1 / 10	01	8,33	01	10,00
• 1 / 20	02	16,67	0	0
• 1 / 40	02	16,67	02	20,00
• 1 / 80	01	8,33	01	10,00
• 1 / 160	01	8,33	0	0
TOTAL COM CISTO	37	100,00	38	100,00
• Não Reagente	09	24,32	10	26,32
• Reagente	28	75,68	28	73,68
• 1 / 1	05	17,86	11	39,29
• 1 / 5	05	17,86	03	10,71
• 1 / 10	06	21,43	06	21,43
• 1 / 20	02	7,14	01	3,57
• 1 / 40	05	17,86	04	14,29
• 1 / 80	04	14,28	03	10,71
• 1 / 160	01	3,57	0	0

Não reagente x Reagente: *Cysticercus cellulosae* → p=0,1954; *Cysticercus longicollis* → p=0,0666.

Quanto ao teste imunoenzimático para a pesquisa de anticorpos de pacientes com cistos em atividade com antígeno *C. cellulosae* 20 (100%) em 20 amostras analisadas foram soro-reagentes. Para o antígeno *Cysticercus longicollis* teve um total de 20 (95,24%) em 21 amostras foram soro-reagentes (TABELA 4). Dos 21 pacientes com cistos ativos, 01 paciente (amostra n.º19)

apresentou diferenças quanto a reatividade nos testes imunoenzimáticos ao comparar-se a utilização de dois antígenos diferentes (TABELA 4 e QUADRO 7).

TABELA 4 - RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO, EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CISTOS EM ATIVIDADE NO ENCÉFALO, UTILIZANDO ANTÍGENOS *Cysticercus cellulosae* E *Cysticercus longicollis*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

RESULTADOS	IFI Cc		IFI Cl		ELISA Cc		ELISA Cl	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
+	16	84,21	18	85,71	20	100,00	20	95,24
-	03	15,79	03	14,29	0	0	01	4,76
TOTAL (amostras)	19	100,00	21	100,00	20	100,00	21	100,00

Cysticercus cellulosae x *Cysticercus longicollis*: IFI → p = 0,6185; ELISA → p = 0,5122.

No grupo de pacientes com cistos calcificados para o teste de IFI com *Cysticercus cellulosae* foram avaliadas 18 amostras com 66,6% destas mostrando reatividade frente ao antígeno. Para o antígeno heterólogo 17 amostras foram analisadas com 58,82% positivas (TABELA 5).

Para amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com cistos calcificados 06 (33,33%) e 07 (41,18%) foram não-reagentes na prova de imunofluorescência indireta, para os antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* respectivamente. Para o teste imunoenzimático 12 (66,67%) em 18 amostras foram reagentes para o antígeno *Cysticercus cellulosae* e 09 (50%) em 18 para o antígeno *Cysticercus longicollis* (TABELA 5).

TABELA 5 - RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO, EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CALCIFICAÇÕES NO ENCÉFALO, UTILIZANDO ANTÍGENOS *Cysticercus cellulosae* E *Cysticercus longicollis*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

RESULTADOS	IFI Cc		IFI Cl		ELISA Cc		ELISA Cl	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
+	12	66,67	10	58,82	12	66,67	09	50,00
-	06	33,33	07	41,18	06	33,33	09	50,00
TOTAL (amostras)	18	100,00	17	100,00	18	100,00	18	100,00

Cysticercus cellulosae x *Cysticercus longicollis*: IFI → $\chi^2_{\text{calc}}=0,02$ e p=0,8966; ELISA → $\chi^2_{\text{calc}}=0,46$ e p = 0,4990.

Quando soma-se todas as amostras do grupo de estudo (cistos em atividade e cistos calcificados) verifica-se que no teste de IFI para *Cysticercus cellulosae* 28 (75,68%) em 37 amostras de líquido cefalorraquiano são soro-reagentes e para *Cysticercus longicollis* este número é de 28 (73,68%) em 38 examinadas. Para o teste imunoenzimático verifica-se que 32 (84,21%) em 38 são reagentes frente ao antígeno homólogo e 29 (74,36%) em 39 frente ao antígeno heterólogo (TABELA 6).

TABELA 6 - RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO, EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CISTOS VIVOS, DEGENERADOS E CALCIFICAÇÕES NO ENCÉFALO, UTILIZANDO ANTÍGENOS *Cysticercus cellulosae* E *Cysticercus longicollis*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

RESULTADOS	IFI Cc		IFI Cl		ELISA Cc		ELISA Cl	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
+	28	75,68	28	73,68	32	84,21	29	74,36
-	09	24,32	10	26,32	06	15,79	10	25,64
TOTAL (amostras)	37	100,00	38	100,00	38	100,00	39	100,00

Cysticercus cellulosae x *Cysticercus longicollis*: IFI → $\chi^2_{\text{calc}}=0,00$ e $p=0,9464$; ELISA → $\chi^2_{\text{calc}}=0,62$ e $p = 0,4328$.

Resultado do Teste IFI Utilizando os Antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*

Em relação ao resultado do teste IFI (não reagente x reagente) quando comparado com os grupos de pacientes com cistos em atividade em relação aos com cistos calcificados, constatou-se não haver diferença significativa entre eles (TABELA 3).

Valores Obtidos no Teste ELISA Utilizando os Antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*

Em relação aos antígenos do teste ELISA quando comparado com os grupo de pacientes com cistos em atividade em relação ao grupo de amostras de pacientes com cistos calcificados, constatou-se que os valores para ELISA com *Cysticercus longicollis* foram menores para as amostras de pacientes com cistos calcificados (medianas de 0,929 e 0,236) ($p=0,015$) (QUADRO 8).

As demais comparações com o grupo controle se tornam desnecessárias em razão de que a maioria apresentaram sorologia não reagente, portanto valores bem mais baixos do que as amostras de pacientes com cisto.

QUADRO 8 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO TESTE ELISA UTILIZANDO OS ANTÍGENOS *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* DOS PACIENTES COM CISTO E DO GRUPO CONTROLE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

ELISA	N.º	MÉDIA (DO)	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
<i>Cysticercus cellulosae</i>	89	0,366	⁽¹⁾ 0,522	0,000	2,018	0,083
• COM CISTO	38	0,781	⁽¹⁾ 0,579	0,013	2,018	0,662
• Em Atividade	20	0,923	⁽¹⁾ 0,503	0,272	2,018	0,763
• Calcificados	18	0,624	⁽¹⁾ 0,631	0,013	1,819	0,381
• CONTROLE	51	0,057	⁽¹⁾ 0,056	0,000	0,205	0,040
<i>Cysticercus longicollis</i>	90	0,402	⁽¹⁾ 0,553	0,000	1,934	0,129
• COM CISTO	39	0,797	⁽¹⁾ 0,630	0,006	1,934	0,578
• Em Atividade	21	0,996	⁽¹⁾ 0,566	0,282	1,934	0,929
• Calcificados	18	0,565	⁽¹⁾ 0,635	0,006	1,826	0,236
• CONTROLE	51	0,099	⁽¹⁾ 0,163	0,000	1,131	0,057

(1) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

Em Atividade x Calcificados: *Cysticercus cellulosae* → $z=1,856$ e $p=0,063$;

Cysticercus longicollis → $z=2,423$ e $p=0,015$.

5.3.2. Grupo Controle

Para as 51 amostras de líquido cefalorraquiano de indivíduos do grupo controle a pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* no teste de imunofluorescência indireta mostrou 100% de pacientes não reagentes quando foram utilizados os antígeno *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* (TABELA 7 e ANEXO 4, QUADRO 12).

Entre as 51 amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes do grupo controle com diversos diagnósticos (ANEXO 4, QUADRO 10), uma amostra (nº11) mostrou, no teste imunoenzimático, densidade óptica acima do ponto de corte (soro-reagente) quando utilizado o antígeno *Cysticercus longicollis* (ANEXO 4, QUADRO 12).

TABELA 7 - RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E IMUNOENZIMÁTICO EM 51 AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES DO GRUPO CONTROLE, UTILIZANDO EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE *Cysticercus cellulosae* E *Cysticercus longicollis*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

RESULTADOS	IFI <i>Cc</i>		IFI <i>Cl</i>		ELISA <i>Cc</i>		ELISA <i>Cl</i>	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
+	0	0	0	0	0	0	01	1,96
-	51	100,00	51	100,00	51	100,00	50	98,04
TOTAL (amostras)	51	100,00	51	100,00	51	100,00	51	100,00

Cysticercus cellulosae x *Cysticercus longicollis*: ELISA → p = 0,5000.

5.4. ESTUDO DOS INDICADORES DOS TESTES IMUNOLÓGICOS COM AMOSTRAS COM DIAGNÓSTICO PROVÁVEL

5.4.1. Teste de Imunofluorescência Indireta

Das amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com cistos vivos e/ou degenerados, submetidas ao teste, três (15,79%) e três (14,29%) resultaram em falsos negativos, utilizando antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*, respectivamente (TABELA 4). Do total de 51 amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes do grupo controle, submetidas ao teste de imunofluorescência indireta, 100% foram não reagentes utilizando os antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* (TABELA 7).

Para determinação da sensibilidade, especificidade, valores preditivos e Índice de Youden do teste de imunofluorescência indireta utilizando *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*, dos pacientes com neurocisticercose e do grupo controle foram construídas duas matrizes para cálculos (TABELAS 8, 12 e 14).

Entre todas as amostras de pacientes (com cistos vivos, degenerados e com calcificações) nove eram falsos negativos (24,32%) e 28 (75,68%) verdadeiros positivos e entre os pacientes do grupo controle, não houve falso positivo (TABELA 6).

Entre as amostras examinadas de pacientes com cistos em atividade e com calcificações, utilizando antígeno de *Cysticercus longicollis*, 10 eram falsos negativos (26,32%) e 28 (73,68%) verdadeiros positivos (TABELA 6). Dos pacientes do grupo controle, 51 (100,00%) eram verdadeiros negativos e nenhum falso positivo (TABELA 7).

A sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste de imunofluorescência indireta, no diagnóstico da neurocisticercose, utilizando os antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*, em amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com cistos em atividade e com calcificações apresentaram especificidade e valor preditivo positivo de 100% em todas as situações (TABELA 8). O índice de concordância variou de 95,71% para amostras de pacientes com cistos em atividade e 91,30% as amostras de pacientes com calcificações. Quando se considera o total de amostras o índice de concordância para *Cysticercus cellulosae* é de 89,77% e para *Cysticercus longicollis* é de 88,76% (TABELA 8).

TABELA 8 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALORES PREDITIVOS, ÍNDICE DE YOUTEN, CONCORDÂNCIA E DISCORDÂNCIA DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA APLICADOS A AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES PORTADORES DE CISTOS COM ATIVIDADE, CALCIFICAÇÕES E TOTAL, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

INDICADORES	COM ATIVIDADE		CALCIFICAÇÕES		TOTAL	
	IFI Cc (%)	IFI Cl (%)	IFI Cc (%)	IFI Cl (%)	IFI Cc (%)	IFI Cl (%)
Sensibilidade	84,21	85,71	66,67	58,82	75,68	73,68
Especificidade	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Valor preditivo (+)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Valor preditivo (-)	94,44	94,44	89,47	87,93	85,00	83,61
Índice de Youden	84,21	85,71	66,67	58,82	75,68	73,68
% Concordância	95,71	95,83	91,30	89,71	89,77	88,76
% Discordância	4,29	4,17	8,70	10,29	10,23	11,24

5.4.2. Teste Imunoenzimático

Trinta e nove amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com neurocisticercose e 51 de pacientes do grupo controle foram submetidas ao teste imunoenzimático, utilizando-se dois antígenos: um homólogo (*Cysticercus cellulosae*) e outro heterólogo (*Cysticercus longicollis*). São apresentados nas tabelas os indicadores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e índices de Youden, de concordância e de discordância dos testes realizados (TABELAS 9 a 12).

TABELA 9 - NÚMERO E PERCENTUAL DE PACIENTES TESTADOS PELO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO, GRUPO DE ESTUDO E GRUPO CONTROLE, COM ANTÍGENOS DE *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

RESULTADOS	GRUPO DE ESTUDO				GRUPO CONTROLE			
	ELISA Cc		ELISA Ci		ELISA Cc		ELISA Ci	
Reagentes	32	84,21	29	74,36	0	0	01	1,96
Não reagentes	06	15,79	10	25,64	51	100,00	50	98,04
TOTAL (amostras)	38	100,00	39	100,00	51	100,00	51	100,00

Nota: ponto de corte para *Cysticercus cellulosae* 0,210 e para *Cysticercus longicollis* igual ou maior a 0,306 de densidade óptica.

Grupo de Estudo: $\chi^2_{\text{calc}}=0,62$ e $p=0,4328$; Grupo Controle: $p = 0,5000$.

Entre as 38 amostras analisadas pelo método imunoenzimático, utilizando antígeno de *Cysticercus cellulosae*, do grupo de estudo seis (15,79%) não reagiram, caracterizando falsos negativos. Entre as amostras do grupo controle nenhuma foi falso positiva (TABELA 10).

TABELA 10 - REAGENTES E NÃO REAGENTES, DOS GRUPOS DE ESTUDO E CONTROLE, NO TESTE IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO ANTÍGENO DE *Cysticercus cellulosae*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

RESULTADOS	GRUPO DE ESTUDO	GRUPO CONTROLE	TOTAL
Reagentes	32	0	32
Não reagentes	06	51	57
TOTAL	38	51	89

Trinta e nove amostras analisadas pelo método imunoenzimático, com antígeno de *Cysticercus longicollis*, 10 foram não reagentes, demonstrando a significativa presença de 10 amostras falso negativas (TABELA 11).

TABELA 11 - REAGENTES E NÃO REAGENTES, DOS GRUPOS DE ESTUDO E CONTROLE, NO TESTE IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO ANTÍGENO DE *Cysticercus longicollis*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

RESULTADOS	GRUPO DE ESTUDO	GRUPO CONTROLE	TOTAL
Reagentes	29	01	30
Não reagentes	10	50	60
TOTAL	39	51	90

Os coeficientes de sensibilidade para a prova de enzimoimunoensaio foram 100,00% e 95,24% para os antígenos de *C. cellulosae* e *C. longicollis*, respectivamente. Os coeficientes de especificidade e valores preditivos do teste foram de 100,00% e 95,24% para *C. cellulosae* e *C. longicollis*, respectivamente, quando foram utilizadas amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com cistos em atividade. Quando analisadas as amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com calcificações no encéfalo os coeficientes de sensibilidade são menores, ficando na faixa de 66,67 e 50,00%, para os dois antígenos utilizados respectivamente (TABELA 12).

TABELA 12 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALORES PREDITIVOS POSITIVO E NEGATIVO, ÍNDICE DE YODEN, CONCORDÂNCIA E DISCORDÂNCIA DOS TESTES DE IMUNOENZIMÁTICOS APLICADOS A AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CISTOS EM ATIVIDADE, CALCIFICAÇÕES E TOTAL, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

INDICADORES	COM ATIVIDADE		CALCIFICAÇÕES		TOTAL	
	ELISA Cc (%)	ELISA C/ (%)	ELISA Cc (%)	ELISA C/ (%)	ELISA Cc (%)	ELISA C/ (%)
Sensibilidade	100,00	95,24	66,67	50,00	84,21	74,36
Especificidade	100,00	98,04	100,00	98,04	100,00	98,04
Valor preditivo (+)	100,00	95,24	100,00	90,00	100,00	96,67
Valor preditivo (-)	100,00	98,04	89,47	84,75	89,47	83,33
Índice de Youden	100,00	93,28	66,67	48,04	84,21	72,40
% Concordância	100,00	97,22	91,30	85,51	93,26	87,78
% Discordância	0,00	2,78	8,70	14,49	6,74	12,22

5.5. ANÁLISE DA EFICÁCIA DOS TESTES IMUNOLÓGICOS COM AMOSTRAS COM DIAGNÓSTICO PROVÁVEL

Amostras de Pacientes com Cistos em Atividade

Comparando-se os resultados obtidos para a Imunofluorescência Indireta com o padrão ouro, nas 21 amostras de indivíduos com cistos em atividade, utilizando antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*, verifica-se que não há diferença significativa ($Q=3,50$; $p=0,1797$). Desse modo as verdadeiras sensibilidades para os antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* foram 84,2% e 89,5% respectivamente (TABELA 13).

Na comparação dos resultados obtidos para o teste imunoenzimático com o padrão ouro, também não foi constatada diferença significativa ($Q=1,00$; $p=0,6147$). As verdadeiras sensibilidades foram 100,0% para *Cysticercus cellulosae* e 95,0% para o *Cysticercus longicollis* (TABELA 13).

Amostras de Pacientes com Calcificações

Comparando-se os resultados obtidos para a Imunofluorescência Indireta com o padrão ouro, nas 18 amostras de indivíduos com cistos calcificados, utilizando antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*, verifica-se que há diferença significativa, ou seja, *Cysticercus cellulosae* apresentou mais indivíduos verdadeiros positivos do que o *Cysticercus longicollis* ($Q=12,29$; $p=0,0040$). Desse modo as verdadeiras sensibilidades para os antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* foram 64,7% e 58,8% respectivamente (TABELA 13).

Na comparação dos resultados obtidos para o teste imunoenzimático com o padrão ouro, também foi constatado mais indivíduos verdadeiros positivos no *Cysticercus cellulosae* do que no *Cysticercus longicollis*, com diferença significativa ($Q=13,00$; $p=0,0026$). As verdadeiras sensibilidades foram 66,7% para *Cysticercus cellulosae* e 55,6% para o *Cysticercus longicollis* (TABELA 13).

Total de Amostras

Comparando-se os resultados obtidos para a imunofluorescência indireta com o padrão ouro, nas amostras de indivíduos do grupo de estudo, utilizando antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*, verifica-se que não há diferença significativa ($Q=3,82$; $p=0,1565$). Desse modo as verdadeiras sensibilidades para os antígenos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* foram 75,0% e 75,0% respectivamente (TABELA 13).

Na comparação dos resultados obtidos para o teste imunoenzimático com o padrão ouro foi constatado mais indivíduos verdadeiros positivos no *Cysticercus cellulosae* do que no *Cysticercus longicollis*, com diferença significativa ($Q=14,00$; $p<0,0010$). As verdadeiras sensibilidades foram 84,2% para *C. cellulosae* e 76,3% para *C. longicollis* (TABELA 13).

Comparação entre as Sensibilidades

Comparando-se os coeficientes de sensibilidade estimados com os do padrão ouro, verifica-se que os resultados são muito próximos, portanto as análises apresentadas são fidedignas (TABELA 13).

TABELA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE AS SENSIBILIDADES, ESTIMADAS E REAIS, DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E IMUNOENZIMÁTICOS APLICADOS A AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM CISTOS EM ATIVIDADE, CALCIFICAÇÕES E TOTAL, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

TESTES	COM ATIVIDADE		CALCIFICAÇÕES		TOTAL	
	Estimado	Real	Estimado	Real	Estimado	Real
IFI <i>Cc</i>	84,21	84,2 a	66,67	64,7 c	75,68	75,0 g
IFI <i>Cl</i>	85,71	89,5 a	58,82	58,8 d	73,68	75,0 g
ELISA <i>Cc</i>	100,00	100,0 b	66,67	66,7 e	84,21	84,2 h
ELISA <i>Cl</i>	95,24	95,0 b	50,00	55,6 f	74,36	76,3 i

Nota: letras diferentes significam diferença estatística. Ao contrário, diferença não significativa.

5.6 EFICÁCIA DAS REAÇÕES IMUNOLÓGICAS UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO EM UMA POPULAÇÃO COM DIAGNÓSTICO DEFINITIVO DE NEUROCYSTICERCOSE

Foram selecionadas amostras com grau de certeza diagnóstica definitivo. Todas as amostras já confirmadas pelo diagnóstico de imagem foram estudadas a partir de um outro “gold standard” – os testes sorológicos utilizados na rotina (IFI/ELISA) com o antígeno convencional (*C. cellulosae*). Para os cálculos de comparação entre uma técnica sorológica padrão com antígeno padrão e usando antígeno heterólogo, foi utilizada a matriz de cálculos a seguir (PEREIRA, 1995, P. 369):

Matriz para cálculo de indicadores

		IFI e/ou ELISA <i>Cysticercus cellulosae</i>		
		Positivo	Negativo	Total
<i>Cysticercus longicollis</i>	Positivo	VP (a)	FP (b)	a + b
	Negativo	FN (c)	VN (d)	c + d
	Total	a + c	b + d	N a+b+c+d

Através dessa matriz foram calculados os índices epidemiológicos (principalmente o índice de classificação correta (percentual de concordância) e o de classificação incorreta (percentual de discordância). Os dados constam da TABELA 14 e do ANEXO 4 (TABELAS 15 e 16).

TABELA 14 – EFICÁCIA DAS REAÇÕES IMUNOLÓGICAS UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO EM UMA POPULAÇÃO COM DIAGNÓSTICO DEFINITIVO DE NEUROCISTICERCOSE, CURITIBA – PARANÁ - 2000

TESTES	COM ATIVIDADE	CALCIFICAÇÕES	TOTAL
IFI <i>Cysticercus longicollis</i>			
• Sensibilidade	90,5	90,9	90,6
• Valor Preditivo (+)	100,0	100,0	100,0
• % de Concordância	90,5	90,9	90,6
• % de Discordância	9,5	9,1	9,4
ELISA <i>Cysticercus longicollis</i>			
• Sensibilidade	95,2	83,3	90,9
• Valor Preditivo (+)	100,0	100,0	100,0
• % de Concordância	95,2	83,3	90,9
• % de Discordância	4,8	16,7	9,1

Para o teste de imunofluorescência indireta o diagnóstico definitivo (evidência de lesões sugestivas de neurocisticercose nos exames de neuroimagem e positividade dos testes imunológicos para anticorpos anticisticercos) os índices de sensibilidade variaram de 90,5% para as amostras de pacientes com cistos em atividade, 90,9% para aquelas de pacientes com calcificações e 90,6% quando se mensura o total de amostras (em atividade, mais calcificações). Os resultados dos índices de concordância se mostraram similares (FIGURA 11).

Para o teste imunoenzimático a sensibilidade foi de 95,2% para as amostras de pacientes com cistos em atividade. Para as amostras de pacientes com calcificações a sensibilidade foi de 83,3% (FIGURA 12).

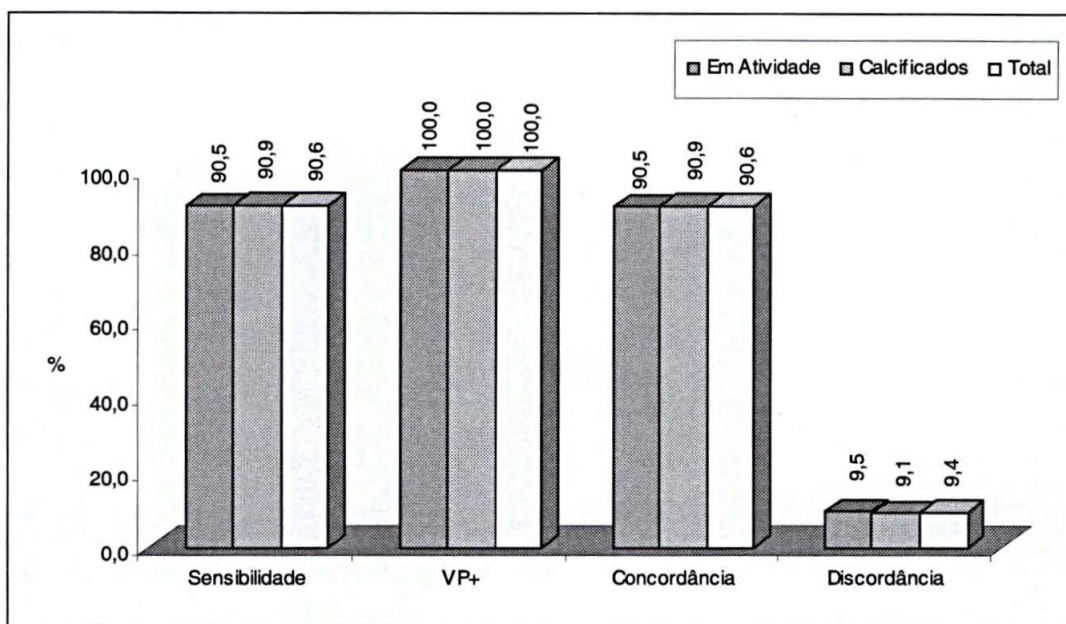


FIGURA 11 – ÍNDICES EPIDEMIOLÓGICOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, CURITIBA – PARANÁ – BRASIL 2000. FONTE: TABELA 14

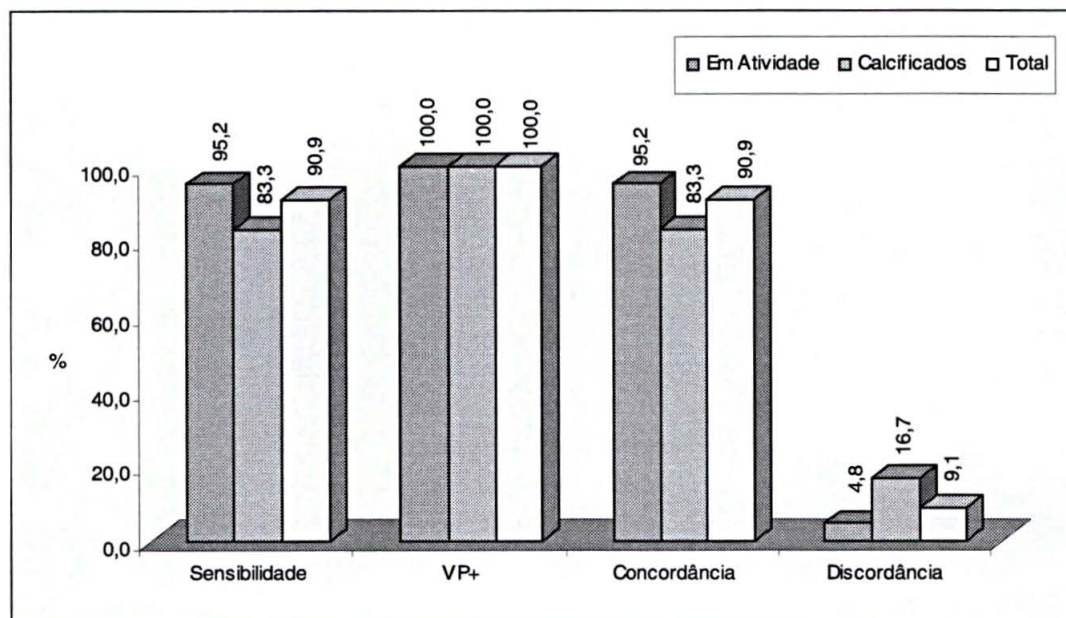


FIGURA 12 - ÍNDICES EPIDEMIOLÓGICOS DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO, CURITIBA – PARANÁ – BRASIL 2000. FONTE: TABELA 14

6. DISCUSSÃO

Em laboratórios produtores de extratos antigênicos para o imunodiagnóstico da neurocisticercose uma das dificuldades para produzi-los, é a obtenção da matéria-prima. Tecido muscular de suínos infectados naturalmente com *Cysticercus cellulosae* são de complexa obtenção. Para ter uma boa qualidade e lotes homogêneos, é preciso dispor de animais com infecções maciças para a produção de grandes lotes de antígeno. No entanto, várias dificuldades são encontradas. Uma delas é a distância entre o local que o animal é encontrado do laboratório para processamento. Outra, é a conservação do material que pode entrar em autólise prejudicando os resultados, ou seja a capacidade antigênica.

A alternativa de trabalhar com *Cysticercus longicollis* permite a obtenção de materiais biológicos com todo o ciclo de produção acontecendo dentro da unidade de pesquisa. Não há também dependência de fatores externos que poderiam comprometer o processo. A cepa ORF, obtida por infecção intraperitoneal de camundongos, em fêmeas da raça Swiss, é de fácil manipulação, de manutenção pouco onerosa, ocupa pouco espaço nos infectórios, e não traz riscos de contaminação ao ser humano. Ao contrário, infecções experimentais em suínos com ovos de *Taenia solium*, na tentativa de obter *Cysticercus cellulosae*, poderiam trazer graves conseqüências ambientais ao disseminar ovos com alta potência infectante. Além disso, a manutenção de suínos em biotérios, por serem animais de médio porte, torna-se mais complexa e de maiores custos.

Assim, a multiplicação em laboratório e em condições padronizadas, de larvas de *Taenia crassiceps* em camundongo, abre boas perspectivas para a produção de antígeno heterólogo em larga escala. Este antígeno possibilita uma boa reprodutibilidade, além de ter um baixo custo de produção.

Para produzir o antígeno de *Cysticercus longicollis* foram inoculadas fêmeas de camundongos, raça Swiss, com idades variando de quatro a oito semanas. A taxa de sobrevivência dos camundongos inoculados foi de 90% ao longo do experimento. Cada camundongo produziu em média 300 vesículas larvárias após 90 dias da inoculação, denotando um bom rendimento quando comparado com os resultados de VAZ (1993, p. 34) e

BUENO (1999, p. 45) que obtiveram em média 500 cistos em camundongos da raça Balb/c.

Outro fator que pesa a favor do antígeno heterólogo é o tempo de obtenção do antígeno e equipamentos necessários para sua preparação. Por exemplo, para a produção do antígeno com *Cysticercus cellulosae* é necessário passar por uma fase de sonicação para extração.

Para produzir os antígenos de *Taenia solium*, para os testes de imunofluorescência indireta e enzimoimunoensaio, foram processados respectivamente 780 e 798 cisticercos obtendo-se 45 e 192 ml de antígenos posteriormente liofilizados, com concentração protéica de 0,36 mg/ml. Para os antígenos de *Taenia crassiceps* utilizou-se 600 e 500 vesículas, obtendo-se 44 e 49 ml de antígenos liofilizados para os testes de imunofluorescência indireta e enzimoimunoensaio, respectivamente. A concentração protéica obtida foi de 1,3mg/ml para o antígeno de enzimoimunoensaio após liofilização. Para o teste imunoenzimático usando antígeno de *Cysticercus longicollis*, foi possível produzi-lo a partir do líquido vesicular sem sonicação. Estes cistos possuem pseudo-escólex não requerendo trituração ou crio-extração. Para a produção do antígeno de *Cysticercus cellulosae* foi necessário romper o escólex, proceder a sonicação e centrifugação. O rendimento de líquido vesicular de *Cysticercus cellulosae* foi muito baixo quando comparado com o de *Cysticercus longicollis*. Esta dificuldade com relação a *Cysticercus cellulosae* é apontada por BUENO (1999, p. 77) o que pode resultar em antígenos de menor sensibilidade.

O tempo despendido para preparação dos extratos antigênicos é também outro aspecto a ser levado em consideração. Para se obter cerca de 1.578 escólices de *Cysticercus cellulosae* foram despendidas cerca de seis horas, com a mobilização de quatro pessoas para dissecar os tecidos musculares. A obtenção de 1100 vesículas de *Cysticercus longicollis* consumiu não mais do que uma hora, com auxílio de um ajudante. O antígeno heterólogo mostrou-se também com grande rentabilidade para a produção de antígeno particulado. Após a preparação obteve-se de 20 a 30 partículas por campo. Enquanto que para *C. cellulosae* foram obtidas de 10 a 20 partículas do antígeno por campo microscópico. Partidas de antígenos de larvas de *Taenia solium*, sobretudo de extrato total (membrana + líquido vesicular +

escólex), podem ser responsáveis pela promoção de reações imunológicas inespecíficas, pois é inevitável a presença de proteínas musculares dos suínos (PINTO, 1998, p. 89). No caso da utilização de líquido vesicular (para ELISA) e mesmo de extrato salino total (para IFI) de *Cysticercus longicollis* a possibilidade da presença de proteínas do hospedeiro são reduzidas quando comparadas a extração de cistos de suínos.

Uma das vantagens do líquido cefalorraquiano no teste imunoenzimático é que não origina reações cruzadas quando se usa líquido cefalorraquiano em indivíduos com outras helmintíases. Isto se deve às características particulares da barreira hematoencefálica quando comparadas às do soro. No presente trabalho deu-se preferência para trabalhar com LCR. Bueno (1999, p. 93) trabalhou com saliva, plasma/soro e LCR, concluindo que na rotina diagnóstica os dois últimos espécimes podem ser escolhidos para testes de triagem, uma vez que fornecem resultados concordantes.

No teste de imunofluorescência indireta ambos os extratos antigênicos mostraram-se de alta especificidade (100,00%), entre portadores e não portadores de cisticercos no encéfalo (TABELA 8). Entre as 21 amostras de líquido cefalorraquiano estudadas, de pacientes com cistos em atividade ou em degeneração, a sensibilidade foi de 84,21% para *Cysticercus cellulosae* e de 85,71% para *Cysticercus longicollis*. Entre as amostras de pacientes com calcificações a sensibilidade para o antígeno homólogo foi de 64,67% e para o heterólogo de 58,82% (TABELA 13).

Obtivemos resultados de sensibilidade no teste imunoenzimático de 100,00% para *Cysticercus cellulosae*, e 95,24% para *Cysticercus longicollis*. Quando comparados os coeficientes obtidos entre as amostras de pacientes portadores de cistos calcificados no encéfalo verifica-se queda na sensibilidade e especificidade. A sensibilidade para *Cysticercus cellulosae* foi de 66,67% enquanto para *Cysticercus longicollis* foi de 50,00% (TABELA 12).

Entre as 39 amostras de líquido cefalorraquiano de pacientes com neurocisticercose, sendo 21 (53,85%) com cistos vivos e/ou degenerados e 18 (46,15%) com cistos calcificados no encéfalo, os falsos negativos nos testes de imunofluorescência indireta foram: 9 (24,32%) para *Cysticercus cellulosae* e 10 (26,32%) para *Cysticercus longicollis* (TABELA 6). Para o mesmo segmento de indivíduos, utilizando o teste imunoenzimático, foram

falsos negativos: seis (15,79%) e 10 (25,64%) amostras, quando utilizou-se *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis* respectivamente (TABELA 6). Como consequência dos falsos positivos, os valores preditivos negativos dos testes de imunofluorescência indireta situaram-se em patamares de 94,44% para os dois antígenos (TABELA 8). Para o teste imunoenzimático os valores preditivos negativos ficaram nos patamares de 100,00% e 98,04% (TABELA 12).

É esperado que muitos pacientes tenham sido submetidos a punção liquórica para imunodiagnóstico da neurocisticercose e concomitantemente ao tratamento com corticóides para redução de sintomas como a hidrocefalia ou início de infecção e baixa taxa de IgG. Das 18 amostras de indivíduos com calcificações seis e sete não apresentaram resultados congruentes ao diagnóstico por imagem quando se utilizou a técnica de IFI e os antígenos homólogo e heterólogo, respectivamente. Para o teste imunoenzimático o mesmo grupo apresentou incongruência do padrão ouro em seis e dez amostras, respectivamente, para *C. cellulosae* e *C. longicollis* (TABELAS 9 a 11). BUENO (1999, p. 82) obteve em líquido cefalorraquiano e utilizando o teste imunoenzimático 80 e 93% de positividade para pacientes com neurocisticercose, mostrando a capacidade de detecção de anticorpos em várias fases da doença. Uma possibilidade para justificar a ausência de anticorpos da classe IgG no líquido cefalorraquiano de pacientes comprovadamente portadores de cisticercos no SNC é o tempo transcorrido entre os primeiros sintomas, a punção liquórica e a resposta imune do hospedeiro. Anticorpos da classe IgG são formados em níveis significativos e detectáveis na fase crônica da enfermidade. Apesar destas eventuais discrepâncias os testes IFI e ELISA são empregados de forma rotineira para confirmar o diagnóstico clínico quando as técnicas de imagem não estão disponíveis ou seus resultados não são conclusivos, já que a imagem é inespecífica e as técnicas imunológicas são complementares.

A sensibilidade para o teste de imunofluorescência indireta, entre os indivíduos com cisticercos em atividade, foi de 84,21 e 85,71% para *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*, respectivamente, o que credencia o antígeno heterólogo, pois não houve diferença significativa (TABELA 8). PIALARISSI, VAZ e SOUZA (1987, p. 372) trabalhando com

antígeno homólogo, obtiveram no teste de imunofluorescência indireta, em 125 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose, sensibilidade de 87,2% e especificidade de 98,9%.

Os resultados obtidos pelo método imunoenzimático são qualitativos, já que não existe correlação entre os valores de absorvância e os aspectos clínicos da enfermidade. Portanto, um valor de absorvância em líquido cefalorraquiano superior ao valor de corte da prova é positivo e confirmatório da enfermidade, no caso em que o indivíduo tenha sintomas neurológicos sugestivos de neurocisticercose e independentemente do valor do título informado. No presente trabalho o teste de ELISA apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 100% usando antígeno homólogo *Cysticercus cellulosae*. Para o antígeno heterólogo a prova de ELISA apresentou sensibilidade de 95,24% e especificidade de 98,04% (TABELA 12). Esta prova tem alta sensibilidade, entre 75 e 90%. Sua sensibilidade pode ser melhorada com o local de coleta do líquido cefalorraquiano. No entanto, todas as amostras foram provenientes de punções liquóricas lombares e nenhuma ventricular, impossibilitando comparações quanto ao local de coleta do líquido cefalorraquiano.

COSTA, FERREIRA e MAKINO (1982, p. 339) e VAZ, NUNES e PIAZZA (1997, p. 356) encontraram sensibilidade no teste imunoenzimático de 100,00% utilizando antígeno de membrana e escólex de *Taenia solium*. PIALARISSI, VAZ e SOUZA (1987, p. 372) apuraram sensibilidade de 97,6% e especificidade de 98,9% em amostras de líquido cefalorraquiano, teste de enzimoimunoensaio, trabalhando com antígeno homólogo. LARRALDE, SOTELO e MONTOIA (1990, p. 926) obtiveram sensibilidade para *Cysticercus longicollis* de 92 e 97% e especificidade de 96 e 98%, em dois laboratórios diferentes.

Sensibilidades maiores na prova de ELISA foram obtidas por COSTA, FERREIRA e MAKINO (1982, p. 339), 100% e VAZ, (1993, p. 54) também 100%. No entanto, LARRALDE, SOTELO e MONTOIA (1990, p. 926) obtiveram em dois laboratórios distintos sensibilidades de 92 e 97% respectivamente utilizando antígeno de *Taenia solium*. ARAMBULO, WALLS e BULOOCKS (1978, p. 63-67) utilizando o método imunoenzimático em amostras de soro de pacientes suspeitos de cisticercose obtiveram 77,55% de

positividade. VAZ, NUNES e PIAZZA (1997, p. 356) utilizando antígeno heterólogo para diagnóstico da neurocisticercose em 46 amostras de LCR, obteve no teste de imunofluorescência indireta 84,8% de sensibilidade e 100,00% de especificidade nas 45 amostras do grupo controle. Com o antígeno homólogo os mesmos autores obtiveram 82,6% de positividade e 100,00% de especificidade. No mesmo trabalho não foram observadas diferenças entre os antígenos homólogo e heterólogo no teste IFI, sugerindo que o antígeno particulado de *Cysticercus longicollis* pode ser empregado alternativamente em laboratórios de diagnóstico da neurocisticercose para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano humano. Os dados obtidos no presente trabalho corroboram os resultados obtidos pelos diferentes autores.

A sensibilidade real do teste de imunofluorescência indireta quando comparada a prova de certeza (tomografia axial computadorizada) é de 75,00% e 75,00% no conjunto de amostras do grupo de estudo. Aumenta quando se trabalha apenas com os dados referentes às amostras de pacientes com cistos em atividade (84,2% e 89,5%) e decresce (64,7% e 58,8%) nas amostras de pacientes com calcificações no encéfalo (TABELA 13).

No presente trabalho a sensibilidade para o antígeno *Cysticercus cellulosae* foi de 64,7% e para o antígeno heterólogo foi de 58,8% no teste de imunofluorescência indireta com amostras de pacientes com calcificações no encéfalo (TABELA 13). Neste mesmo grupo a prova de enzimoimunoensaio apresenta a verdadeira sensibilidade de 66,7% e 55,6% respectivamente para os antígenos homólogo e heterólogo. A sensibilidade do teste ELISA, segundo FLISSER, MADRAZO e DELGADO (1997, p. 56) pode variar de 0 a 44% quando os pacientes são portadores de cisticercos calcificados. A resposta imunológica é dependente de diferentes componentes antigênicos do parasita e nas situações em que os cisticercos estão exclusivamente calcificados o reconhecimento antigênico pode não ocorrer ou ficar diminuído.

Foi analisada a eficácia das provas de IFI e ou ELISA com antígeno heterólogo, utilizando como referência o antígeno convencional de imunodiagnóstico com antígeno de *Cysticercus cellulosae* sendo portanto o "gold standard" os resultados dos testes sorológicos convencionais

(IFI/ELISA) utilizando o antígeno padrão e caracterizando a importância do imunodiagnóstico como segunda alternativa além da neuroimagem. Desta forma com 33 amostras de LCR ficou caracterizado o diagnóstico de certeza definitivo. A sensibilidade das provas utilizando antígeno de *Cysticercus longicollis* apresentaram para IFI 90,5% e 90,9%, amostras com cistos em atividade e com calcificações respectivamente. Igualmente para ELISA os percentuais de sensibilidade foram de 95,2 e 83,3% (TABELA 14).

Portanto, os dados obtidos no presente trabalho referendam a metodologia como método de triagem e permitem concluir que o melhor teste entre os dois estudados para diagnóstico da neurocisticercose, utilizando amostras de líquido cefalorraquiano foi o de ELISA. No entanto, a soma de métodos com princípios diferentes pode também ser um fator importante para a melhoria da qualidade dos resultados de testes-diagnóstico.

O antígeno de *Cysticercus longicollis* pode ser um bom substituto do antígeno de *Cysticercus cellulosae* em laboratórios de imunodiagnóstico, sendo substancialmente melhor nos aspectos de homogeneização de lotes.

7. CONCLUSÃO

Duas provas de imunodiagnóstico foram padronizadas: Imunofluorescência Indireta (IFI) e Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA), para pesquisa, em líquido cefalorraquiano, de anticorpos, anti-*Cysticercus cellulosae* para indivíduos portadores de neurocisticercose.

Dois antígenos foram estudados: um homólogo (*Cysticercus cellulosae*) e outro heterólogo (*Cysticercus longicollis*).

1- Para o teste de imunofluorescência indireta o número de partículas, por campo, no aumento de 400 vezes ficou estabelecido em 20 a 30. A diluição do conjugado foi 1:250.

2- O teste imunoenzimático ficou assim padronizado:

Concentração de antígeno : 01µg/orifício

Titulação do líquido cefalorraquiano: 1/1

Diluição do Conjugado: 1:3000

Ponto de corte – *Cysticercus cellulosae* densidade óptica • 0.210

Ponto de corte – *Cysticercus longicollis* densidade óptica • 0.306

A análise de todas as amostras com diagnóstico de certeza definitivo, utilizando como padrão ouro um teste convencional (IFI e/ou ELISA) com antígeno homólogo padrão, demonstrou que a eficácia real do antígeno heterólogo ficou assim estabelecida em amostras de pacientes com cistos em atividade:

1 - Para IFI: 90,5%.

2 - Para ELISA: 95,2%.

Entre as amostras de pacientes com cisticercos calcificados e com grau de certeza diagnóstica definitivo a eficácia real foi de 90,9% e 83,3% para os testes de IFI e ELISA, respectivamente quando se utilizou antígeno heterólogo, referendando o referido antígeno para as situações de pacientes com neurocisticercose exclusivamente com calcificações.

Em função dos resultados obtidos o antígeno heterólogo pode ser utilizado como alternativa ao antígeno homólogo. O rendimento e o controle das variáveis ambientais na manutenção da cepa e os indicadores dos testes permitem a utilização deste componente biológico para extratos antigênicos.

GLOSSÁRIO

Antígeno - componente do agente agressor que provoca no organismo agredido uma reação, por parte do sistema imunológico, produzindo anticorpos contra o corpo estranho. O antígeno pode ser vírus, bactéria ou parasito. No presente caso, são os *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*.

Bloqueador - solução química que bloqueia a reação. Possui pH ácido ou alcalino forte dependendo do substrato utilizado.

Conjugado anti IgG humana marcado com peroxidase - é um reagente específico e imprescindível para a técnica de ELISA. Na reação o anticorpo que se liga ao antígeno, será adsorvido por esse conjugado para depois ser marcado pelo substrato.

Efetividade – é o grau em que uma determinada intervenção, procedimento, regime ou serviço produz um resultado benéfico, quando empregado no “mundo real”, em uma população definida. É o resultado verdadeiramente observado nas condições habituais de uso. É uma abordagem usada na verificação da qualidade em condições usuais.

Eficácia – é o grau em que uma determinada intervenção, procedimento, regime ou serviço produz um resultado benéfico, em condições “ideais” de observação; trata-se do resultado no laboratório. Indica a utilidade ou o benefício de um teste em condições ideais.

Eficiência – refere-se aos efeitos alcançados em relação ao esforço despendido, em termos de recursos e tempo utilizados. É o resultado obtido, tendo em conta os insumos empregados. É o rendimento dos recursos.

Espectrofotômetro - aparelho elétrico que lê as densidades ópticas da microplaca.

Incubador de placa - estufa elétrica que serve para incubar a microplaca na temperatura exigida pela técnica de ELISA.

Lavador de placa - aparelho elétrico munido de 8 a 12 orifícios onde há a passagem de tampão para proceder a lavagem da microplaca para retirar o excesso de anticorpo ou conjugado, dependendo da fase da reação. O lavador pode ser manual, semi-automático ou automático.

Microplaca - material plástico, transparente composto por 96 orifícios com capacidade de até 400µl cada orifício que serve para proceder a reação de ELISA.

Substrato OPD - o-Phenyldiamine . 2HCl. Reagente químico que, ao final da técnica, dá a reação de cor ao teste de ELISA. A cor produzida é proporcional à quantidade de anticorpo presente. Reagente sensível à luz, devendo ser guardado em frasco âmbar e ao abrigo da luz.

Coefficiente de variação - O coeficiente de variação, por expressar o desvio-padrão dividido pela média, tem a vantagem de facilitar comparações. O resultado não tem unidades, sendo expresso em porcentagens. A interpretação é semelhante à do desvio-padrão. Quanto menor o coeficiente de variação, melhor o nível de reprodutibilidade. Testes com menor coeficiente de variação tendem a produzir resultados mais consistentes.

Desvio-padrão - Em medidas quantitativas, quando são feitas repetidas mensurações de um mesmo evento, o desvio-padrão informa sobre o nível de reprodutibilidade. Quanto menor o desvio-padrão, mais próximos estão os resultados um do outro, o que significa melhor reprodutibilidade.

Incidência e prevalência - A incidência de uma doença se refere aos casos novos e a prevalência aos casos existentes. A primeira é dinâmica e a segunda é estática. Para conhecer a incidência, especifica-se a duração do tempo de observação de surgimento de casos novos. A prevalência de um evento informa o número de casos existentes. Nos seus resultados estão misturados casos novos e casos antigos.

$$\text{Taxa de Incidência} = \frac{\text{Número de casos novos, em determinado período}}{\text{Número de pessoas expostas ao risco, no mesmo período}} \times \text{Constante}$$

$$\text{Taxa de Prevalência} = \frac{\text{Número de casos existentes}}{\text{Número de pessoas na população}} \times \text{Constante}$$

Reprodutibilidade - (confiabilidade, fidedignidade, repetibilidade ou precisão), de um teste diagnóstico é a consistência ou concordância de resultados quando a medição ou exame se repete em condições idênticas.

Validade - (acuidade, acurácia ou exatidão). Refere-se ao grau em que o exame é apropriado para medir o verdadeiro valor daquilo que é medido, observado ou interpretado. A validade informa se os resultados representam a “verdade” ou quanto se afastam dela. Em um teste diagnóstico, a questão a ser investigada é a sua capacidade de discriminar corretamente doentes e sadios.

Validade em relação a um padrão - Refere-se a quanto, em termos quantitativos, um teste é útil para diagnosticar um evento (validade simultânea ou concorrente) ou para predizê-lo (validade preditiva). Para tal, comparam-se os resultados do teste com os de um padrão: esse pode ser o verdadeiro estado do paciente, se tal informação está disponível, um conjunto de exames julgados mais adequados ou uma outra forma de diagnóstico que sirva como referencial.

Modelo para avaliação de um teste diagnóstico

Matriz para os cálculos, segundo PEREIRA (1995, p.369).

TESTE	DOENTES	SADIOS	TOTAL
Positivo	Verdadeiro Positivo (a)	Falso-Positivo (b)	a + b
Negativo	Falso-Negativo (c)	Verdadeiro Negativo (d)	c + d
TOTAL	a + c	b + d	N

N = número total de examinados	=	a + b + c + d
Sensibilidade	=	a / a + c
Especificidade	=	d / b + d
Prevalência (real)	=	a + c / N
Prevalência estimada (teste)	=	a + b / N
Valor preditivo positivo	=	a / a + b
Valor preditivo negativo	=	d / c + d
Classificação correta	=	a + d / N
Classificação incorreta	=	b + c / N
Índice de Youden	=	(a / a + c) + (d / b + d) - 1

Nota: Indicadores expressos em porcentagem.

Sensibilidade - capacidade que o teste apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, diagnosticar corretamente os doentes.

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Verdadeiros positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

Especificidade - capacidade que o teste tem de detectar os verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos sadios.

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{Falsos positivos} + \text{Verdadeiros negativos}} \times 100$$

Valor preditivo positivo - é a proporção de doentes entre os considerados positivos ao teste.

$$\text{Valor preditivo positivo (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Verdadeiros positivos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

Valor preditivo negativo - é a proporção de sadios entre os negativos ao teste.

$$\text{Valor preditivo negativo (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{Falso negativos} + \text{Verdadeiros negativos}} \times 100$$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A.P.F.; VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M. Immunoperoxidase for the detection of antibodies in cerebrospinal fluid in neurocysticercosis - use of *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus longicollis* particles fixed on microscopy slides. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.38, n.4, p.259-263, 1996.
- ARAMBULO, P.V.; WALLS, K.W.; BULOCK, S. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). **Acta Trop.**, Basel, v. 35, p. 63-7, 1978.
- ARRUDA, W.O. Neurocysticercosis: an epidemiological survey in two small rural communities. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo, v.48, n.4, p. 419-424,1990.
- BIONDI, G.F. **Emprego do teste imunoenzimático ELISA indireto no soro diagnóstico da cisticercose suína.** São Paulo, 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN)** - Paraná. Curitiba : SESA, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n.º 196 de 10 de outubro de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.201, p.21082-21085, 16 de outubro de 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Produtos de Origem Animal. Delegacia Federal de Agricultura no Estado do Paraná. Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Sistema Integrado de Estatística Animal. **RIISPOA**, Brasília. Decreto n.º 30691 de 20/03/52.
- BRASIL. Portaria n.º 1.461, de 22 de dezembro de 1999. Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, v.137, n.245, 23 dez 1999.
- BUENO, E.C. **Neurocisticercose: avaliação da resposta imune humoral nas diferentes fases evolutivas da doença pelo ELISA e imunoblot com antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps*.** São Paulo,1999. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyes binding. **Anal. Biochem.**, San Diego, v. 72, p. 242-54, 1976.
- CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977. 120 p.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. International task force for diseases eradication. *MMWR (Morb. Mortal. Wkly. Rep.)*, Atlanta, v. 4, n. RR 16, p. 8 –12, Dec. 1993.
- COSTA, J.M.; FERREIRA, A.W.; MAKINO, M.M. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v.24, n.6, p. 337-341, nov./dez., 1982.
- COSTA, J.M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. *Arq. Neuro-psiquiatr.*, São Paulo, v.44, n.1, mar. 1986.
- COSTA-CRUZ, J. M. et al. Ocorrência de cisticercose em necropsia realizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Arq. Neuro-psiquiatr.*, São Paulo, v.53, n.2, p. 227-32, 1995.
- DEAN, J.; DEAN, A.; BURTON, A.; DICKER, R. **Public domain software for epidemiology and disease surveillance**. version 6.04b. Atlanta, January, 1997.
- DEL BRUTO, O.H. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. *J. Neurol. Sci.*, Amsterdam, v.142, p.1-6, 1996.
- FERREIRA, A.P.; VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M. Hemagglutination test of for the diagnosis of human neurocysticercosis - Development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v.39, n.1, p.29-33, 1997.
- FLISSER, A.; MADRAZO, I.; DELGADO, H. **Cisticercosis humana**. México: Manual Moderno, 1997. p. 1-64.
- FREEMAN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. *Can. J. Zool.*, Ottawa, v.40, p. 969-990, 1962.
- GIRÓN, E. T.; RAMOS, M. C.; DUFOUR, L. E. Aplicacion de metodo ELISA para el diagnóstico de la cisticercosis. *Bol. Oficina. Sanit. Panam.*, Washington, v.97, n.1, p. 8-13, jul.1984.
- GLANTZ, S. A. **Primer of biostatistics**. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 1997.
- GUSSO, R.L.F. Teniose e cisticercose. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, São Paulo, v.6, n.2, p. 457- 463, 1997.
- GUSSO, R.L.F.; CAMARGO, N.J.; SILVA, L.R. Controle da teniose e cisticercose no Estado do Paraná. *Hig. Alim.*, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 45-46, 1999.
- GUIDELINE for surveillance, prevention and control of taeniasis/cysticercosis. Geneva: World Health Organization, 1983. (OMS VPH/83.49).

- GUIMARÃES, R. X. **Clínica e laboratório**. 2 ed. São Paulo: Xavier, 1978.155p.
- HOFFMANN, R.P. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. Porto Alegre: Sulina,1987. 120 p.
- INFORME de la Reunion Técnica sobre Normatizacion y Estratégias para la Implementacion del Inmunodiagnóstico de la Cisticercosis Humana. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis, 1989. p. 291-293.
- KUCHENMEISTER F. Offenes Sendschreiben an die K.k. Gesellschaft der Aertze zu Wien. Experimenteller Nachweis, dass *Cysticercus cellulosae* innerhalb des menschlichen Darmkanales sich in *Taenia solium* umwandelt. *Wiener medizinische Wochen-schrift*, 1855. p.1-4.
- LANGE, O. Síndrome liquórico da cisticercose encéfalo-meningéia. **Rev. Neurol. Psiquiatr.**, São Paulo, v.6, n.2, p. 35-48, 1940.
- LARRALDE, C., SOTELO, J., MONTOIA, R. M. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Northfield, v.114, p.926-928, 1990.
- LINO Jr, R.S.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A. Ocorrência de cisticercose (*Cysticercus cellulosae*) encefálica e cardíaca em necropsias. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.33, n.5, p.495-498, 1999.
- LIVRAMENTO, J.A. Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraquiano ao estudo da neurocisticercose. **Arq. Neuro-psiquiatr.**, São Paulo, v.39, p. 261-78, 1981.
- LONARDONI, M.V.C.; BERTOLINI, D.A. ; SILVEIRA, T.G.V. Frequência de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em indivíduos de cinco municípios da região Norte do Estado do Paraná – Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.30, n.3, p.273-279, 1996.
- MACHADO, A. de J.; CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S. Reação de imunofluorescência para cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas a lâminas de microscopia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.7, n.3, p.181-183, maio/jun. 1973.
- MALPIGHI, M. **Opera posthuma**. Quibus praefixa est vita, a seipso scripta, A et J Churchill, Londini, 1697. 187 p.
- MINOZZO, J.C. **Teníase e cisticercose**. Teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para imunodiagnóstico da cisticercose bovina. Curitiba, 1997. Tese (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

- MOSES, J. Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cisticercoses. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.3, p. 320-7, 1911.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Epidemiologia y control de la teniasis/cisticercosis en América Latina. Version 3.0. Washington, D.C.: OPS, OMS, 1994. (PNSP/91-28).
- PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. resolução N.º 19/94. Institui o Programa Estadual de Controle da Teníase e Cisticercose e Norma Técnica Especial(NTE) a inclusão da Cisticercose Humana na lista de doenças de notificação compulsória. **Diário Oficial do Estado**, Curitiba, 1994.
- PAUL, J.R.; WHITE, G. **Serological epidemiology**. London: Academic Press, 1973. 235 p.
- PAWLOWSKI, Zbigniew; SCHULTZ, Miron G. **Taeniasis and cysticercosis (Taenia saginata)**, 1972. p. 269-275.
- PEREIRA, Maurício Gomes. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p.358-376; p.460.
- PESSOA, Samuel B. ; MARTINS, Amílcar Vianna. **Parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
- PIALARISSI, C.S.M.; VAZ, A.J.; SOUZA, A.M.C. Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.29, n.6, p.367-373, nov./dez. 1987.
- PINTO, P.S.A. **Diagnóstico imunológico da cisticercose suína como contribuição à inspeção de carnes**. São Paulo, 1998. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.
- PROAÑO, J. Programa de controle da cisticercose no Equador. In: SEMINÁRIO LATINO AMERICANO SOBRE TENÍASE E CISTICERCOSE, 1., 1994, Curitiba. **Anais**. Curitiba: SESA; UFPR; OPAS; MS; FNS, 1994. p. 45-48.
- REUNIÃO DE CONSULTA DA OPAS/OMS SOBRE O COMPLEXO TENÍASE/CISTICERCOSE, 1995, Brasília: Relatório. Washington, D.C., OPAS, 1997. 21 p. (**OPAS, Série HCT/AIEPI**, 5).
- REIS, J.B.; BEI, A.; REIS-FILHO, J.B. Líquido cefalorraquiano na cisticercose encefálica. **Arq. Neuro-psiquiatr.**, São Paulo, n.37, p.113-26, 1979.
- ROMÁN, G. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. **Bull. WHO**, Geneva, v.78, p. 399-406, 2000.
- ROUQUAYROL, Maria Zélia. **Epidemiologia & saúde**. 4.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993. 540 p.

- RUMLER, J. U. Secto a me, in capite, pustulae supra duram meningem apparuerunt, erosa ipsa et cerebro per foramina eminente pluribus in locis. **Observationes Medicae**, 1558.
- SIMONETTI, A. B.; TEIXEIRA, J. Comportamento da reação de imunofluorescência indireta e de alguns parâmetros do líquido cefalorraquiano na neurocisticercose. **Arq. Neuro-psiquiatr.**, São Paulo, v.45, p. 33-43, 1987.
- SOTELO, J.; GUERRERO, V.; RUBIO, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.145, p. 442-445, 1985.
- SPIEGEL, M.R. **Estatística**. São Paulo: McGraw-Hill, 1976. 580 p.
- TAKAYANAGUI, O. M.; JARDIM, E. Aspectos clínicos da neurocisticercose: análise de 500 casos. **Arq. Neuro-psiquiatr.**, São Paulo, v.41, p. 50-63, 1983.
- THOMAZ-SOCCOL V.; PAULINO, R.C.; CASTRO, E.A. Estudo da viabilidade de ovos de helmintos no lodo obtido por tratamento anaeróbio (ETE) e anaeróbio (RALFS), Curitiba, novembro 1996. Estado da Arte - Projeto interdisciplinar para o desenvolvimento de critérios sanitários, agrônômicos, e ambientais para a implantação da reciclagem do lodo de esgoto. Curitiba: **SANEPAR/PADCT**, 1996.
- TYSON, E. *Lumbricus latus*, or a discourse read before the Royal Society, of the jointed worm, wherein a great many mistakes of former writers concerning it, are remarked; its natural history from more exact observations is attempted; and the whole urged, as a difficulty against the doctrine of univocal generation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B-Biol. Sci.**, v.13, p.113-144, 1683.
- VAUGHAN, J.P. **Epidemiologia para municípios**: manual para gerenciamento dos distritos sanitários. São Paulo: HUCITEC, 1997. p.143-162; p.173-178.
- VAZ, A. J. **Cysticercus longicollis**: caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana. São Paulo, 1993. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; BARRETO, C.C. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis - use of heterologous antigenic particles (*Cysticercus longicollis*) in indirect immunofluorescence test. **Serodiagnosis and Immunoth. Infect. Disease**, v.8, p.157-161, 1997.
- VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; CAMARGO, M.E. Dot-Elisa for the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in cerebrospinal fluid using a new solid phase (Resin-treated polyester fabric) and *Cysticercus longicollis* antigens.

- Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.38, n.6, p.391-396, 1996.
- VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.F. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.53, n.3, p.354-357, 1997.
- VIANNA, L. G. Estudo comparativo dos testes imunoenzimáticos ELISA G e ELISA M, imunofluorescência indireta e fixação de complemento no diagnóstico da cisticercose humana. **Arq. Neuro-psiquiatr.**, v.50, p.302-308, 1992.
- VILLA, M.F.G. Situação epidemiológica do complexo teniose e cisticercose como problema de saúde pública no Brasil. **Hig. Alim.**, São Paulo, v.9, n.36, p.8-11, 1995.
- WEINBERG, G. M. – Recherche des anticorps spécifiques dans la distomatose et la cysticercose. **C.R.Soc. Biol.**, Paris, v.66, p.219-21, 1909.

ANEXOS

ANEXO 1

PROPOSTA PARA CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DA CISTICERCOSE HUMANA E NEUROCISTICERCOSE - PROPOSAL OF DIAGNOSTIC CRITERIA FOR HUMAN CYSTICERCOSIS AND NEUROCYSTICERCOSIS (DEL BRUTO, 1996).

Critérios Absolutos

- 1-Demonstração histológica do parasita em biópsia de nódulo subcutâneo ou lesão cerebral.
- 2-Visualização direta do parasita no exame fundoscópico.
- 3-Evidência de lesões císticas com escólex na TAC ou RNM.

Critérios Maiores

- 1-Evidência de lesões sugestivas de neurocisticercose nos exames de neuroimagem*
- 2-Positividade dos testes imunológicos para anticorpos anticisticercos**
- 3-Presença de calcificações fusiformes no RX de músculos da coxa e pernas.

Critérios Menores

- 1-Presença de nódulos subcutâneos.
- 2-Evidência de calcificações puntiformes no RX de crânio ou de partes moles
- 3-Presença de manifestações clínicas sugestivas de neurocisticercose***
- 4-Desaparecimento de lesões intracranianas após administração de drogas parasiticidas.

Critérios Epidemiológicos

- 1-Indivíduos procedentes ou residentes de área endêmica em cisticercose
- 2-História de viagens freqüentes a áreas endêmicas em cisticercose.
- 3-Evidência de contato domiciliar com infecção pela *T. solium*

*TAC ou RNM evidenciando lesões císticas, lesões com reforço anelar, calcificações intracranianas, hidrocefalia e reforço anormal das leptomeninges. Mielografia mostrando múltiplas falhas de enchimento na coluna de contraste.

**Imunoblotting no soro e ELISA no líquido cefalorraquiano

***Epilepsia, sinais neurológicos focais, síndrome de hipertensão intracraniana e demência.

Graus de Certeza Diagnóstica da Cisticercose Humana

Diagnóstico definitivo

- 1-Presença de 1 critério absoluto
- 2-Presença de 2 critérios maiores

3- Presença de 1 critério maior e de 2 menores, além de 1 critério epidemiológico

Diagnóstico Provável

1- Presença de 1 critério maior e de 2 menores

2- Presença de 1 critério maior e de 1 menor, além de 1 critério epidemiológico

3- Presença de 3 critérios menores e de 1 critério epidemiológico

Diagnóstico Possível

1- Presença de 1 critério maior

2- Presença de 2 critérios menores

3- Presença de 1 critério menor e 1 epidemiológico

ANEXO 2

**REAGENTES, VIDRARIA, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS
COMPLEMENTARES PARA CONFECÇÃO DOS ANTÍGENOS DE
Cysticercus cellulosae E *Cysticercus longicollis***

Reagentes:

- álcool 70° GL (elaborado no CPPI),
- álcool etílico P.A.(marca Grupo Química),
- éter etílico P.A.(marca Quimespar),
- água destilada estéril (destilador Fabber-Primar modelo 106),
- sílica gel azul (marca Sigma),
- soro de coelho 0,5% (Biotério CPPI),
- camundongos da raça Swiss, fêmeas (Biotério CPPI),

Vidraria:

- pistilo, gral, pipetador de borracha, proveta graduada de 100 ml, balão para 250 ml, pipeta de 2 e 10 ml, pipeta "Pasteur", bastão de vidro, becker para 100 ml, tubo para centrífuga refrigerada de 100 ml,

Equipamentos:

- balança analítica de precisão (marca Micronal mod. B-4000),
- estufa incubadora a + 37°C (marca Fanem mod. 347),
- centrífuga refrigerada (marca Hitachi mod. SCR-20),
- bomba de aspiração a vácuo, 110 V, pressão 40 mm Hg (marca Fanem),
- freezer -20°C (marca Indrel), geladeira (marca Climax),
- autoclave (marca Fabber-Primar),
- agitador magnético (marca Sisatom mod. 407-A)
- sonicador (marca Lab-Line),
- isotonzador (marca Ultra-tipe).
- dessecador de vidro (marca Pyrex),
- liofilizador (marca Edwards mod. Liomax-1),
- microscópio ótico (marca Leitz mod. HL-LUX)

Materiais complementares:

- cuba para gelo, gelo picado, pinça anatômica, metálica, de ponta fina, bisturi, com lâmina n.º 23, espátula, luva descartável para procedimentos, máscara descartável, gorro descartável, seringa descartável de 05, 10 e 20 ml (marca B-D), agulha descartável calibres 30 x 8 e 40 x 12 (marca B-D),
- recipiente para descarte (marca B-D mod. Descartex), bandeja de aço inoxidável, tábua de polipropileno, impermeável, para manipulação de carne, faca de necropsia, tesoura metálica,

ANEXO 3

**REAGENTES, VIDRARIA, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS
COMPLEMENTARES UTILIZADOS NA REALIZAÇÃO DAS PROVAS DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO.**

Reagentes:

- conjugado fluorescente para pesquisa de imunoglobulinas humanas específicas pela reação de imunofluorescência indireta (Fluoline G, marca Biolab-Mérieux S.A.)
- conjugado anti-IgG humana ligada com peroxidase (marca Sigma, lote 034H8808) para teste imunoenzimático
- OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride (2HCl) (Abbott laboratories)
- tween 80, tween 20, água oxigenada a 30 %, citrato de sódio, cloreto de sódio, gelatina, ácido fosfórico, etanol 95 %, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio
- fosfato ácido de sódio, fosfato ácido de potássio, azul de Evans, glicerina líquida

Vidraria:

- tubo descartável de poliestireno, 12 x 75mm (marca N.J. Plásticos, mod. tubo cristal), tubo de vidro 13 x 100 mm, frasco de vidro com capacidade para 05 ml, micropipetas 20 e 50 μ l
- lamínula 24 x 60, lâmina para imunofluorescência (marca Biochile)
- pipeta de vidro com capacidade para 01, 05, 10 e 20 ml, bastão de vidro

Equipamentos:

- microscópio de fluorescência (marca Olympus)
- incubadora de placa (marca Microwell System, Incubator 500)
- microplaca (marca Maxishort intermed)
- lavadora automática (marca Microwell System Washer 400)
- leitor de microplaca (Microwell System Reader 210)
- pipeta automática de 25,50,100,200 e 250 μ l
- pipeta multicanal com 12 canais, capacidade de distribuição 5 – 50 μ l (marca Boeco, Germany), pipeta multicanal com 12 canais, capacidade de distribuição 50 – 200 μ l (marca Boeco, Germany)
- balança de precisão, medidor de pH (marca Quimis, mod.Q-400-0), “freezer” vertical -20°C, marca Consul, mod. Freezer Slim)

Materiais complementares:

- placa para teste imunoenzimático com 96 orifícios (Marca Nunc, Intermed, mod. Maxishorp), algodão hidrófilo, rolha para tubo de vidro com diâmetro de 13 mm
- seringa descartável de 10 ml (marca B-D), ponteira para pipeta automática 10 e 100 μL (marca eppendorf), flaconete para 800 μL (marca eppendorf), fita adesiva para identificação, etiqueta para identificação de frascos
- flaconete com capacidade para 800 μl , lâmina de bisturi descartável (n.º23), papel filtro

ANEXO 4
RESULTADOS ESTADÍSTICOS

TABELA 15 - RESULTADOS OBTIDOS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E TESTE IMUNOENZIMÁTICO EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE 21 INDIVÍDUOS COM CISTOS EM ATIVIDADE, UTILIZANDO ANTÍGENOS *Cysticercus cellulosae* E *Cysticercus longicollis*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

N.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
IFI <i>Cc</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	i	+	+	+	+	+	i
IFI <i>Cl</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ELISA <i>Cc</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	i	+	+	+
ELISA <i>Cl</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Nota: i – material insuficiente; (+) soro-reagente; (-) soro não reagente;

IFI *Cc* - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

IFI *Cl* - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus longicollis*;

ELISA *Cc* - teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

ELISA *Cl* - teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus longicollis*.

TABELA 16-RESULTADOS OBTIDOS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE 18 INDIVÍDUOS COM CALCIFICAÇÕES NO ENCÉFALO. PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Cysticercus cellulosae*, UTILIZANDO EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE *Cysticercus cellulosae* E *Cysticercus longicollis*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

N.º	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
IFI <i>Cc</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
IFI <i>Cl</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	i	-	+	+	-	+
ELISA <i>Cc</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
ELISA <i>Cl</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+

Nota: i – material insuficiente; (+) soro-reagente; (-) soro não reagente;

IFI *Cc* - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

IFI *Cl* - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus longicollis*;

ELISA *Cc* – teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

ELISA *Cl* - teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus longicollis*.

TABELA 17 - NÚMERO DE AMOSTRAS SELECIONADAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES DO GRUPO CONTROLE, POR DIAGNÓSTICO, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

DIAGNÓSTICO	NÚMERO	PERCENTUAL
Meningite	06	11,8
AIDS	06	11,8
Leucemia	04	7,8
Acidente vascular cerebral	04	7,8
Epilepsia	04	7,8
Meduloblastoma desmoplásico	03	5,9
Meningoencefalite tuberculosa	02	3,9
Hidrocefalia	01	2,0
Granuloma intracraniano	01	2,0
Artrose	01	2,0
Calcificação temporal	01	2,0
Compressão medular	01	2,0
Desnutrição protéico calórica	01	2,0
Distrofia muscular	01	2,0
Doença de pequenos vasos	01	2,0
Doença encefaloclástica	01	2,0
Higroma subdural	01	2,0
Hemorragia subaracnóide	01	2,0
Hepatite viral	01	2,0
Insuficiência respiratória	01	2,0
Lesões nervo cubital	01	2,0
Neuropatia sérica	01	1,9
Otomastoidite	01	1,9
Pansinusite	01	1,9
Polineuropatia inflamatória	01	1,9
Processo neoplásico	01	1,9
Sinusopatia maxilar	01	1,9
Síndrome paralítica	01	1,9
Tuberculose/Pneumocistose	01	1,9
TOTAL	51	100,0

QUADRO 9 - NÚMERO DE REGISTRO, INICIAIS DO NOME, MUNICÍPIO, IDADE, SEXO E RESULTADOS DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO APLICADOS A 21 AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE INDIVÍDUOS COM NEUROCISTICERCOSE, PORTADORES DE CISTOS EM ATIVIDADE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

R.H.	INICIAIS	MUNICÍPIO	IDADE	SEXO	IFI Cc	IFI Cl	ELISA Cc	ELISA Cl	DIAGNÓSTICO	
1	2.159	A.G.B.	Curitiba	41	M	1/10	1/10	0,706	0,929	Neurocisticercose
2	1.927	C.E.	Goiô erê	42	M	1/10	1/10	0,461	0,506	Neurocisticercose
3	985	C.Z.	Ampere	25	F	1/10	1/5	0,618	0,363	Neurocisticercose
4	3.274	C.E.	Altônia	34	M	N/R	1/1	0,962	0,578	Neurocisticercose
5	3.301	E.S.M.	Curitiba	39	M	1/80	1/40	1,526	1,488	Neurocisticercose
6	17.233.360	E.B.P.	Curitiba	38	F	1/5	1/10	0,272	0,351	Neurocisticercose
7	3.500	E.G.	Curitiba	71	M	N/R	N/R	0,539	0,883	Neurocisticercose
8	3.379	I.O.	Curitiba	28	M	N/R	1/1	1,184	0,929	Neurocisticercose
9	12.885.466	I.O.	Curitiba	28	M	1/1	1/10	1,155	1,141	Neurocisticercose
10	1.657.696	I.A.P.O.	Curitiba	39	F	1/80	1/80	2,018	1,930	Neurocisticercose
11	15.572.434	J.P.	Curitiba	36	F	1/5	1/1	1,816	0,954	Neurocisticercose
12	1.092	L.A.C.	Curitiba	29	F	1/80	1/80	0,553	1,063	Neurocisticercose
13	5.605.768	M.L.K.	Curitiba	37	F	1/5	1/1	1,275	0,435	Neurocisticercose
14	6.494.838	M.P.	Curitiba	76	M	1/10	1/1	1,561	1,170	Neurocisticercose
15	3.526	N.S.	Curitiba	27	F	MI	1/1	0,298	1,699	Neurocisticercose
16	15.930.276	O.B.S.	Curitiba	58	M	1/40	1/10	0,726	1,934	Neurocisticercose
17	15.930.276	O.B.S.	Curitiba	58	M	1/40	1/20	0,799	1,879	Neurocisticercose
18	3.176	P.V.P.A.	C. Procópio	64	F	1/40	1/40	MI	1,567	Neurocisticercose
19	1.234	A.R.S.	Curitiba	35	M	1/10	1/1	0,590	0,282	Neurocisticercose
20	2.401	B.S.	Guaíra	39	M	1/1	N/R	0,516	0,346	Neurocisticercose
21	3.303	C.N.	Curitiba	34	F	MI	N/R	0,885	0,486	Neurocisticercose

Nota: R.H.: número do registro no laboratório ou hospital de coleta do LCR; MI: material insuficiente; N/R: não reagente;

IFI Cc - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

IFI Cl - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus longicollis*;

Elisa Cc – teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

Elisa Cl – teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus longicollis*.

QUADRO 10 - NÚMERO DE REGISTRO, INICIAIS DO NOME, MUNICÍPIO, IDADE, SEXO E RESULTADOS DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO APLICADOS A 18 AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE INDIVÍDUOS COM NEUROCISTICERCOSE, PORTADORES DE CALCIFICAÇÕES, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

R.H.	INICIAIS	MUNICÍPIO	IDADE	SEXO	IFI Cc	IFI CI	ELISA Cc	ELISA CI	DIAGNÓSTICO	
22	17.435.108	A.P.C.	Curitiba	59	M	N/R	N/R	0,034	0,049	Neurocisticercose
23	3.371	A.C.S.	Curitiba	47	M	1/80	1/80	1,819	1,826	Neurocisticercose
24	6.438.741	A.T.O.	Curitiba	59	F	N/R	N/R	0,023	0,006	Neurocisticercose
25	8.915.482	C.A.B.	Curitiba	30	M	N/R	N/R	0,013	0,032	Neurocisticercose
26	2.398	E.K.	F. Beltrão	48	M	1/5	1/1	0,312	0,538	Neurocisticercose
27	15.903.635	E.B.	Curitiba	37	M	N/R	N/R	0,037	0,015	Neurocisticercose
28	1.371	J.C.B.	Renascença	45	M	1/40	1/5	0,546	0,125	Neurocisticercose
29	3.186	J.E.S.	Curitiba	40	M	1/20	1/40	1,562	1,457	Neurocisticercose
30	2.857	M.S.S.	Curitiba	60	M	1/20	1/10	0,227	0,891	Neurocisticercose
31	11.693.920	M.A.P.F.	Curitiba	27	F	1/1	1/5	1,737	1,063	Neurocisticercose
32	17.400.223	M.A.D.	Curitiba	61	F	N/R	N/R	0,056	0,046	Neurocisticercose
33	2.137	M.O.D.R.	F. Beltrão	29	F	1/10	1/1	0,449	0,141	Neurocisticercose
34	2.583	M.T.S.	Curitiba	71	F	1/160	MI	0,994	1,204	Neurocisticercose
35	12.957.351	M.AP.F.	Curitiba	33	F	1/1	N/R	0,918	0,309	Neurocisticercose
36	3.516	N.M.A.C.	C. Procópio	30	F	1/40	1/40	0,220	1,737	Neurocisticercose
37	2.479	R.L.M.	Curitiba	46	F	1/5	1/1	0,942	0,162	Neurocisticercose
38	17.273.434	S.AP.B.	Curitiba	17	F	N/R	N/R	0,085	0,011	Neurocisticercose
39	14.525.700	S.C.K.	Curitiba	41	F	1/1	1/1	1,255	0,566	Neurocisticercose

Nota: R.H.: número do registro no laboratório ou hospital de coleta do LCR; MI: material insuficiente; N/R: não reagente;

IFI Cc - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

IFI CI - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus longicollis*;

Elisa Cc - teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

Elisa CI - teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus longicollis*.

QUADRO 11 - NÚMERO DE REGISTRO, INICIAIS DO NOME, MUNICÍPIO, IDADE, SEXO, DIAGNÓSTICO, RESULTADOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO APLICADOS ÀS 51 AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

	R.H.	INICIAIS	IDADE	SEXO	IFI Cc	IFI CI	ELISA Cc	ELISA CI	DIAGNÓSTICO
1	17.497.022	A.T.	56	M	-	-	0,034	0,042	Lesões nervo cubital
2	10.462.800	A.S.J. S.	17	M	-	-	0,000	0,000	Polineuropatia inflamatória
3	14.274.162	A.C.M.	36	M	-	-	0,129	0,111	Epilepsia
4	16.124.087	C.V.T.	27	F	-	-	0,056	0,031	Meningite
5	16.124.087	C.V.T.	27	F	-	-	0,023	0,055	Meningite
6	15.400.080	C.M.M.	26	F	-	-	0,023	0,000	Leucemia
7	17.593.480	C.G.S.F.	26	F	-	-	0,003	0,001	Epilepsia
8	10.420.440	C.R.C.	38	M	-	-	0,000	0,052	Hidrocefalia
9	11.257.534	E.L.N.	35	M	-	-	0,120	0,110	AIDS
10	10.434.262	E.R.	30	M	-	-	0,076	0,023	Sinusopatia maxilar
11	16.900.729	E.R.S.	38	F	-	-	0,071	1,131	Meningite
12	14.208.410	E.B.S.	47	M	-	-	0,022	0,045	Doença encefaloclastica
13	2.837.390	E.C.S.	36	F	-	-	0,036	0,095	AVC
14	16.839.485	F.C.S.	31	M	-	-	0,000	0,168	AIDS
15	16.839.485	F.C.S.	31	M	-	-	0,000	0,116	AIDS
16	11.367.631	G.M.L.	46	M	-	-	0,048	0,209	Desnutrição
17	17.700.804	H.A.M.	43	F	-	-	0,040	0,097	Calcificação temporal
18	16.150.118	H.E.M.	44	M	-	-	0,003	0,027	Meduloblastoma desmoplásico
19	16.150.118	H.E.M.	44	M	-	-	0,000	0,022	Meduloblastoma desmoplásico
20	16.150.118	H.E.M.	44	M	-	-	0,017	0,290	Meduloblastoma desmoplásico
21	17.698.567	I.C.	39	M	-	-	0,000	0,000	Tuberculose/Pneumocistose
22	15.537.051	I.P.	36	M	-	-	0,076	0,092	AIDS
23	15.851.716	I.G.H.	53	F	-	-	0,046	0,030	Neuropatia sérica
24	9.395.075	J.M.L.	63	M	-	-	0,124	0,153	Hemorragia subaracnóide
25	8.118.175	J.P.M.	68	M	-	-	0,180	0,054	Doença de pequenos vasos
26	10.538.904	J.M.O.M.	24	F	-	-	0,000	0,021	Epilepsia
27	17.704.460	L.B.	43	M	-	-	0,040	0,079	Hepatite viral
28	14.110.950	L.E.A.S.	23	F	-	-	0,061	0,010	AIDS
29	17.676.830	L.S.B.	22	M	-	-	0,000	0,000	Pansinusite
30	17.266.306	L.C.R.P.	42	M	-	-	0,083	0,010	Insuficiência respiratória
31	17.621.661	M.E.P.D.	60	F	-	-	0,097	0,165	AVC
32	17.286.552	M.J.P.M.	47	F	-	-	0,205	0,148	Higroma subdural
33	17.479.954	M.R.	24	M	-	-	0,026	0,057	Granuloma intracraniano
34	17.678.388	M.R.	43	F	-	-	0,080	0,138	Otomastoidite a esquerda
35	17.122.533	M.R.J.	31	M	-	-	0,028	0,025	Distrofia muscular
36	12.858.310	M.C.R.	14	M	-	-	0,004	0,000	Leucemia linfoblástica aguda
37	12.858.310	M.C.R.	14	M	-	-	0,018	0,018	Leucemia linfoblástica aguda
38	12.858.310	M.C.R.	14	M	-	-	0,173	0,165	Leucemia linfoblástica aguda

Continua

QUADRO 11 – NÚMERO DE REGISTRO, INICIAIS DO NOME, MUNICÍPIO, IDADE, SEXO, DIAGNÓSTICO, RESULTADOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMOIMUNOENSAIO APLICADOS A 51 AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

Conclusão

R.H.	INICIAIS	IDADE	SEXO	IFI Cc	IFI Cl	ELISA Cc	ELISA Cl	DIAGNÓSTICO	
39	14.967.117	M.M.P.Z.	44	F	-	-	0,044	0,058	Artrose carpometacarpiana.
40	2.011.930	J.M.F.	32	M	-	-	0,081	0,041	Epilepsia
41	9.377.522	N.F.	46	M	-	-	0,172	0,058	Meningite
42	9.377.522	N.F.	46	M	-	-	0,052	0,111	Meningite
43	9.377.522	N.F.	46	M	-	-	0,070	0,170	Meningite
44	16.643.076	N.S.	22	M	-	-	0,026	0,059	Síndrome paralítica
45	4.215.796	O.B.O.	38	M	-	-	0,033	0,049	Compressão de med. Espina
46	17.473.611	P.F.	23	M	-	-	0,129	0,115	AIDS
47	13.058.229	P.E.A.	37	M	-	-	0,138	0,235	Meningoencefalite tuberculosa
48	13.058.229	P.E.A.	37	M	-	-	0,000	0,133	Meningoencefalite tuberculosa
49	12.596.669	R.M.O.	70	F	-	-	0,155	0,223	AVC
50	8.832.013	R.P.S.	46	F	-	-	0,049	0,016	AVC
51	2.870.738	S.P.P.	45	M	-	-	0,000	0,000	Processo neoplásico primário

Nota: R.H.: número do registro no laboratório ou hospital de coleta do LCR; MI: material insuficiente; (-): não reagente;

IFI Cc - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

IFI Cl - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus longicollis*;

Elisa Cc – teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

Elisa Cl – teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus longicollis*.

QUADRO 12-RESULTADOS OBTIDOS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, ENZIMOIMUNOENSAIO EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE 51 PACIENTES DO GRUPO CONTROLE. PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Cysticercus cellulosae*, UTILIZANDO EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE *Cysticercus cellulosae* E *Cysticercus longicollis*, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL, 2000.

N.º	IFI Cc	IFI Cl	Elisa Cc	Elisa Cl	N.º	IFI Cc	IFI Cl	Elisa Cc	Elisa Cl
1	-	-	-	-	27	-	-	-	-
2	-	-	-	-	28	-	-	-	-
3	-	-	-	-	29	-	-	-	-
4	-	-	-	-	30	-	-	-	-
5	-	-	-	-	31	-	-	-	-
6	-	-	-	-	32	-	-	-	-
7	-	-	-	-	33	-	-	-	-
8	-	-	-	-	34	-	-	-	-
9	-	-	-	-	35	-	-	-	-
10	-	-	-	-	36	-	-	-	-
11	-	-	-	+	37	-	-	-	-
12	-	-	-	-	38	-	-	-	-
13	-	-	-	-	39	-	-	-	-
14	-	-	-	-	40	-	-	-	-
15	-	-	-	-	41	-	-	-	-
16	-	-	-	-	42	-	-	-	-
17	-	-	-	-	43	-	-	-	-
18	-	-	-	-	44	-	-	-	-
19	-	-	-	-	45	-	-	-	-
20	-	-	-	-	46	-	-	-	-
21	-	-	-	-	47	-	-	-	-
22	-	-	-	-	48	-	-	-	-
23	-	-	-	-	49	-	-	-	-
24	-	-	-	-	50	-	-	-	-
25	-	-	-	-	51	-	-	-	-
26	-	-	-	-					

Nota: (+) soro reagente; (-) soro não reagente;

IFI Cc - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

IFI Cl - teste de imunofluorescência indireta com antígeno *Cysticercus longicollis*;

Elisa Cc - teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus cellulosae*;

Elisa Cl - teste imunoenzimático com antígeno *Cysticercus longicollis*.