

Utilização do teste de eritroimunoadsorção por captura no imunodiagnóstico da neurocisticercose*

Capture erythroimmunosorption test for neurocysticercosis immunodiagnosis

Carmen Silvia de M. Pialarissi***, Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini**

PIALARISSI, C.S. de M. & NITRINI, S.M.O. de O. Utilização do teste de eritroimunoadsorção por captura no imunodiagnóstico da neurocisticercose. *Rev. Saúde Pública*, 28: 116-20, 1994. Foi padronizado o teste de eritroimunoadsorção por captura (EIAC) para detecção de anticorpos específicos anti-cisticercos de *Taenia solium*, classe IgG, no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com neurocisticercose. O reagente empregado para detecção de anticorpos específicos foi preparado com hemácias de carneiro em uma concentração de 0,25%, sensibilizadas com antígeno extrato salino bruto (ESB) obtido do *Cysticercus cellulosae*. A concentração ótima de ESB para sensibilização das hemácias de carneiro foi de 40ug/ml. O rendimento do ESB foi de 0,1ug proteína/cavidade. A sensibilidade do teste foi de 84,5% (limite de confiança 95% de 75% a 94%), quando aplicado a 58 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose; e a especificidade foi de 95,3% (limite de confiança 95% de 90,7% a 99,9%) quando 85 amostras de LCR do grupo controle foram analisadas. O teste EIAC foi eficiente para o diagnóstico da neurocisticercose, e é importante para os laboratórios de saúde pública, tendo em vista a fácil execução, alto rendimento e baixo custo.

Descritores: Cisticercose, diagnóstico. Técnicas de imunoadsorção. Anticorpos anti-helminthos, lesões.

Introdução

A neurocisticercose é uma infecção do sistema nervoso central causada pela larva da *Taenia solium*, constituindo problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, na medida em que as deficientes condições de saneamento ambiental e de educação sanitária estão diretamente envolvidas em sua endemicidade.

A prevalência da neurocisticercose no Brasil não é bem definida pois não existem inquéritos populacionais sistemáticos. Portanto, estudos soroepidemiológicos são importantes para avaliar os casos de infecção e os casos-contatantes na população em geral. Apesar da escassez de dados, alguns autores utilizaram reações sorológicas tais como: reação de fixação de

complemento, hemaglutinação passiva e ELISA para o diagnóstico da neurocisticercose^{1,2,4,10,12,14,15,18,19}.

A padronização de um novo teste para o diagnóstico da infecção, executável nas condições de um laboratório de saúde pública, vem de encontro à necessidade atual de se acrescentar à rotina diagnóstica métodos de maior praticidade e eficiência com sensibilidade e especificidade adequadas às suas finalidades.

O presente trabalho tem por objetivo a padronização de um teste simples para imunodiagnóstico da neurocisticercose, cujo princípio é a modificação de um teste de hemaglutinação passiva, de baixo custo, para ser utilizado principalmente em laboratórios de saúde pública.

Material e Métodos

Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR)

Foram coletadas amostras de LCR de 143 pacientes e conservadas a -20°C até o momento de uso. As amostras foram classificadas em três

* Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da USP - 1992.

** Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - São Paulo, SP - Brasil

*** Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, SP - Brasil
Separatas/Reprints: C.S. de M. Pialarissi - Av. Dr. Arnaldo, 351 - 01246-902 - São Paulo, SP - Brasil
Edição subvencionada pela FAPESP. Processo 94/0500-0

grupos: grupo D = 58 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose, diagnosticados segundo dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, ou seja, pacientes com hipertensão intracraniana ou epilepsia ou ambas, neuroimagem compatível com neurocisticercose e LCR com características inflamatórias e com anticorpos específicos; grupo S = 37 amostras de LCR de indivíduos supostamente não-doentes, com quimiocitológico normal colhidas por ocasião de raquianestésias ou para controle de alta hospitalar após infecções agudas de sistema nervoso; grupo E = 48 amostras de LCR de pacientes com encefalopatias de diferentes etiologias, que não fossem portadores de neurocisticercose.

Antígeno e reagentes

O antígeno utilizado foi o extrato salino bruto (ESB) de cisticercos, obtido segundo a metodologia descrita por Costa⁶ (1983) e empregada com modificações por Vaz e Ferreira¹⁷ (1988).

O ESB foi utilizado no preparo do reagente de hemácias sensibilizadas. Estas foram obtidas utilizando-se hemácias de carneiro fixadas por glutaraldeído³ e sensibilizadas com o antígeno ESB, segundo a técnica de Imai e col.⁹ (1974). A solução estabilizadora das hemácias consistiu de: leite desnatado 0,3% (p/v) em solução fisiológica tamponada com fosfato 0,0375 M, pH = 6,4¹⁶.

A determinação protéica do antígeno foi feita segundo o método de Bradford⁵ (1976).

Padronização da técnica (EIAC)

A técnica padronizada obedeceu o seguinte protocolo:

- as placas de microtitulação foram sensibilizadas com soro de coelho anti-IgG humana diluída a 1:1600 (Dakopatts-Dinamarca), em solução tamponada com carbonato-bicarbonato 0,05M, pH = 9,6, no volume de 0,1 ml por cavidade;

- incubação por 60 min à temperatura ambiente e por 18 h a 4°C;

- lavagem das placas com solução de lavagem (SST-T), solução fisiológica tamponada

com fosfato 0,01M pH = 7,4 adicionada de tween 20 a 0,05%) por três vezes;

- aplicação da amostra de LCR em volume de 0,1 ml em uma coluna da placa, para as hemácias sensibilizadas, e o mesmo volume na coluna seguinte para as hemácias-controle, com a amostra pura e em diluição subsequente na razão 2;

- incubação por 60 min à temperatura ambiente; lavagem das placas com solução de lavagem (SST-T), por três vezes;

- aplicação das hemácias sensibilizadas e das hemácias-controle, em concentração de 0,25% (v/v) e em volume de 0,05ml por cavidade, nas respectivas colunas da placa;

- incubação em câmara úmida por 90 min (20-25°C);

- leitura da reação.

Análise estatística

Foram utilizados os seguintes testes: reprodutibilidade inter-teste e intra-teste, bem como a reprodutibilidade entre diferentes lotes de hemácias frente ao LCR-padrão (diagrama de controle de qualidade, segundo Hoshino-Shimizu e col.⁸ (1986); média geométrica dos títulos (MGT) calculada de acordo com Paul & White¹¹ (1973). Utilizou-se o método do qui quadrado para se verificar o nível de associação, adotando-se para α , o nível de 1% de erro; o desempenho do método foi analisado mediante a determinação da sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo e negativo, e os limites de confiança foram estabelecidos ao nível de 95%^{7,13}.

Resultados

A determinação da concentração protéica final do antígeno resultou em 2,6 mg de proteína por ml.

A concentração de 40ug/ml foi escolhida para sensibilizar os eritrócitos de carneiro na pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *Taenia solium* pelo teste de eritroimunoadsorção por captura, por fornecer reatividade máxima com o LCR-padrão positivo, sem contudo apresentar reação inespecífica com o LCR-padrão negativo (Tabela 1).

Tabela 1 - Títulos obtidos com LCR-padrão em função da concentração protéica do antígeno ESB, no teste de eritroimunoadsorção por captura, para avaliação de anticorpos da neurocisticercose.

ESB Concentração Protéica (ug/ml)	LCR Padrão Positivo	LCR Padrão Negativo
100	NR	NR
60	32	NR
10	1.024	NR
30	1.024	NR
20	256	NR
5	NR	NR

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

ESB - Extrato Salino Bruto

NR - Não Reagente

A avaliação da reprodutibilidade intra-teste foi realizada com os resultados de 10 amostras de LCR positivas e as 10 de LCR negativas, em 5 replicatas. O desvio-padrão (DP) variou entre 0 e 0,58.

A reprodutibilidade inter-teste também foi

avaliada com 10 amostras positivas e 10 negativas em dois dias consecutivos, com um desvio-padrão de 0,58 e 0,67.

O LCR-padrão positivo foi analisado com diferentes lotes de hemácias, em 20 dias e o título variou entre 512 e 4.096. O desvio-padrão médio foi de 1,08 e o limite de aceitação foi de 1,16. O limite de aceitação foi calculado multiplicando-se por 2 o desvio-padrão obtido em ensaio cujo reagente foi considerado adequado.

A distribuição das 143 amostras de LCR de acordo com títulos obtidos no teste de eritroimunoadsorção por captura (EIAC) é apresentada na Tabela 2.

Os títulos obtidos nas 58 amostras do grupo de estudos (D) oscilaram entre 2 a 8.192, com média geométrica (MGT) de 134,24. A MGT do grupo S foi 1 e no grupo E, 1,28.

Os resultados com título igual ou superior a 4 foram considerados significativos, pois o limiar de reatividade ("cut off") igual a 1:4 foi obtido pelo cálculo da média do grupo controle (S e E) mais dois desvios-padrão ($\bar{x} + 2 DP$). Segundo este

Tabela 2 - Número e percentagem de indivíduos, segundo grupos (doentes, não doentes e com encefalopatias) e títulos de EIAC para neurocisticercose

Títulos	Doentes (D)		Não Doentes (S)		C/ Encefalopatias (E)		Total	
	Nº	%*	Nº	%*	Nº	%*	Nº	%*
NR	7	12,1	37	100,0	35	72,9	79	55,2
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2	3,4	-	-	9	18,7	11	7,7
4	3	5,2	-	-	4	8,3	7	4,9
8	1	1,7	-	-	-	-	1	0,7
16	3	5,2	-	-	-	-	3	2,1
32	1	1,7	-	-	-	-	1	0,7
64	3	5,2	-	-	-	-	3	2,1
128	4	6,9	-	-	-	-	4	2,8
256	7	12,0	-	-	-	-	7	4,9
512	6	10,3	-	-	-	-	6	4,2
1.024	10	17,2	-	-	-	-	10	7,0
2.048	7	12,1	-	-	-	-	7	4,9
4.096	3	5,2	-	-	-	-	3	2,1
8.192	1	1,7	-	-	-	-	1	0,7
Total	58	100,0	37	100,0	48	100,0	143	100,0

EIAC - Eritroimunoadsorção por captura

* As percentagens foram calculadas em relação ao total de cada grupo: D, S e E

Tabela 3. Distribuição dos pacientes do grupo de estudo (D) e do grupo controle (S e E) quanto aos resultados no LCR pelo teste EIAC.

EIAC	Doentes (D)		Controle (S + E)		Total
	N	%	N	%	
Positivo	49	84,5	4	4,7	53
Negativo	9	15,5	81	95,3	90
Total	58	100,0	85	100,0	143

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

EIAC - Teste de eritroimunoadsorção por captura

critério, os resultados interpretados como positivos no grupo de doentes totalizaram 84,5% conforme se verifica pela Tabela 3. Houve uma diferença estatisticamente significativa ($x = 90,68$) em relação ao grupo controle (S + E) com $p < 0,001$.

A sensibilidade diagnóstica do teste EIAC obtida nas condições padronizadas foi de 84,5%, com limite de confiança de 95% e intervalos de confiança de 75% - 94%.

A especificidade do teste EIAC foi de 95,3%, com limite de confiança de 95% e intervalo de confiança de 90,7% - 99,9%.

O valor preditivo positivo foi de 92,5% e o valor preditivo negativo foi de 90,0% para a prevalência estudada de 40,6%. A eficiência do teste foi de 90,9% nas condições empregadas.

Discussão

Durante o processo de padronização, algumas variáveis foram importantes tais como temperatura da reação, tempo de leitura, concentração de hemácias de carneiro no reagente preparado e principalmente a solução estabilizadora de hemácias, cuja concentração de leite desnatado e molaridade de solução tampão permitiram a estabilidade de reação, conforme já havia demonstrado Ueda¹⁶ (1988).

A concentração de 40ug/ml em proteína do ESB, utilizada para sensibilizar as hemácias, forneceu bom rendimento do antígeno para a realização de cada teste, na cavidade da placa (0,1ug), tendo em vista os protocolos utilizados na sensibilização das hemácias e na execução

do teste EIAC.

Quanto à reprodutibilidade em 20 diferentes lotes de reagentes de hemácias, houve um desvio-padrão dentro do limite de aceitação previamente determinada com reagente de bom desempenho.

Este teste pode ser aplicado na captura de imunoglobulinas de outras classes, após modificações, bem como em amostras de soro, com vantagens teóricas quanto à sensibilidade em relação a reação de hemaglutinação passiva. A sensibilidade do teste EIAC para anticorpos específicos anti-cisticercos de *Taenia solium*, da classe IgG, no LCR foi de 84,5%. Portanto, o teste foi capaz de demonstrar anticorpos específicos anti-cisticercos de *Taenia solium* da classe IgG em 84,5% dos pacientes com neurocisticercose estudados. A especificidade foi de 95,3%, portanto o teste apresentou negatividade para anticorpos da classe IgG em 95,3% das amostras do grupo controle. Estes índices de desempenho, aliados à reprodutibilidade do teste e à estabilidade do reagente, além da execução simples e o alto rendimento levam a considerá-lo como uma alternativa no diagnóstico da neurocisticercose, e com possível aplicação em inquéritos soroepidemiológicos em laboratórios de saúde pública.

PIALARISSI, C.S. de M. & NITRINI, S.M.O. de O. [Capture erythroimmunoabsorption test for neurocysticercosis immunodiagnosis]. *Rev. Saúde Pública*, 28: 116-20, 1994. The capture erythroimmunoabsorption (C-EIA) test was standardized for detection of *Taenia solium* cysticercus-IgG specific antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) from patients with neurocysticercosis. For the C-EIA test performance a reagent for specific antibody detection was prepared using sheep's red blood cells (SRBC) in a concentration of 0.25% sensitized with crude saline extract antigen (SEA) obtained from *Cysticercus cellulosae*. The optimum concentration of SEA for SRBC sensitization was 40ug/ml. The yield of SEA was 0.1ug protein/cavity. When 58 CSF samples from patients with neurocysticercosis were analysed the sensitivity of the test was found to be 84.5% and the confidence limit of 95% probability (CL 95%) ranged from 75% to 94%. The specificity was 95.3% (CL 95% from 90.7% to 99.9%) when CSF samples from the control group were analysed. The C-EIA test was shown to be efficient for neurocysticercosis diagnosis and important for public health laboratories, because of its low cost, high reagent yield and ease of use.

Keywords: Cysticercosis, diagnosis. Immunosorbent techniques. Antibodies, helminth, cerebrospinal fluid.

Referências Bibliográficas

1. BASSI, G.E., CAMARGO, M.E., BITTENCOURT, J.M.T.; GUARNIERI, D.B. Reação de imunofluorescência com antígenos de *Cysticercus cellulosae* no líquido cefalorraquidiano. *Neurobiologia*, 42:165-70, 1979.
2. BIAGI, F., NAVARRETE, F.; PINA, A.; SANTIAGO, A.M.; TAPIA, L. Estudio de tres reacciones serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis. *Rev. Med. Hosp. Geral, México*, 25:501-8, 1961.
3. BING, D.H.; WEYANG, J.G.M.; STAVITSKY, A.B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigen and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124:1166-70, 1967.
4. BONAMETTI, A.M.; BASILE, M.A.; VAZ, A.Z.; BALDY, J.L.S.; TAKIGUTI, C.K. Índice de positividade da reação imunoenzimática (ELISA) para cisticercose no líquido cefalorraquidiano e no soro de pacientes com epilepsia. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 34:451-8, 1992.
5. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-54, 1976.
6. COSTA, J.M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. São Paulo, 1983. [Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP].
7. GALEN, R.S. & GAMBINO, S.R. *Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis*. New York, John Wiley & Sons, 1975.
8. HOSHINO-SHIMIZU, S.; NAGASSE-SUGAHARA, T.K.; CASTILHO, E.A.; CAMARGO, M.E.; SHIMIZU, T. Diagrama de verificación para evaluar reactivos de hemagglutination usados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Oficina. Sanit. Panam.*, 101:465-76, 1986.
9. IMAI, M.; YAMASHITA, Y.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Haemagglutination inhibition assay of the common determinants and subspecificities of Australia antigen. *Immunology*, 27:871-8, 1974.
10. MACHADO, A.J.; CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S. Reação de imunofluorescência para a cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas a lâminas de microscopia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 7:181-3, 1973.
11. PAUL, J.R. & WHITE, C., ed. *Serological epidemiology*. New York, Academic Press, 1973.
12. PIALARISSI, C.S.M.; VAZ, A.J.; SOUZA, A.M.C.; NAKAMURA, P.M.; CAMARGO, E.D.; SILVA, M.V.; UEDA, M. Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 29:367-73, 1987.
13. SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica*. São Paulo, McGraw-Hill, 1981.
14. SOTELO, J.; GUERRERO, V.; RUBIO, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Arch. Intern. Med.*, 145:442-5, 1985.
15. UEDA, M.; NAKAMURA, P.M.; WALDMAN, E.A.; CHIEFFI, P.P.; SOUZA, A.M.C.; SPIR, M.; GERBI, L.J. Frequência de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em população de risco para cisticercose e em segmento de população considerado supostamente normal em regiões do estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44:25-8, 1984.
16. UEDA, M. Sífilis associada ou não a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS): padronização do teste de eritroimunoadsorção por captura e detecção de anticorpos IgM e IgA anti-*Treponema pallidum* nas diferentes formas da doença sífilítica. São Paulo, 1988. [Tese de Doutorado-Instituto de Ciências Biomédicas da USP].
17. VAZ, A.J. & FERREIRA, A.W. Imunodiagnóstico da neurocisticercose: teste imunoenzimático com antígenos quimicamente ligados a suportes para a pesquisa de anticorpos em soro e líquido cefalorraquidiano. *Rev. Med. Trop. São Paulo*, 30:1-10, 1988.
18. VAZ, A.J.; HANASHIRO, A.S.G.; CHIEFFI, P.P.; FERREIRA, A.W. Frequência de indivíduos com anticorpos séricos anti-*Cysticercus cellulosae* em cinco municípios do Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 23:97-9, 1990.
19. VIANNA, L.G.; MACEDO, V.; COSTA, J.M.; MELLO, P.; SOUZA, D. Estudo soropidemiológico da cisticercose humana em Brasília, Distrito Federal. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 199:149-56, 1986.

Recebido para publicação em 2.8.1993

Reapresentado em 23.11.1993

Aprovado para publicação em 31.1.1994