

# A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES GRUPOS DE SOROS-CONTROLE NO DIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA PELO TESTE ELISA

Paulo Sérgio de Arruda Pinto<sup>1</sup>  
Lílian Lameck Monteiro<sup>2</sup>  
João Carlos Minozzo<sup>3</sup>

## RESUMO

Ensaio do teste Elisa foram desenvolvidos para a análise de amostras de soros de bovinos. As amostras foram constituídas de 80 soros-controle de bovinos com cisticercose, entre natural discreta e experimental maciça, sendo 60 negativos para a doença e dez positivos para outras patologias. Utilizaram-se os antígenos totais de *Taenia solium* e de *T. crassiceps* na determinação de anticorpos contra cisticercose. O referido teste revelou deficiências no diagnóstico de animais destinados ao abate, em virtude de sua baixa sensibilidade, quando se consideraram soros de bovinos com infecção natural discreta, a mais freqüente em matadouros. No entanto, no caso de animais infectados experimentalmente, a sensibilidade aumentou. O teste ainda pode ser considerado útil na diferenciação entre a cisticercose e outras doenças, devido às suas elevadas taxas de especificidade, 81,4% a 100%, sempre alcançando o valor máximo quando os soros-controle negativos eram procedentes de animais confinados. A escolha de soros-controle para o cálculo do ponto de corte interferiu no desempenho do teste Elisa. Quando o ponto de corte envolvendo os soros de animais confinados foi a referência para o diagnóstico da cisticercose, os valores de sensibilidade foram bastante elevados, chegando a 90%. Porém, quando o ponto de corte considerado na avaliação foi calculado a partir de todos os soros-controle negativos (situação não controlada), observou-se uma queda na capacidade do teste em identificar os verdadeiros positivos. Conclui-se que é de grande importância a seleção de soros-controle na interpretação dos resultados do teste Elisa e no estabelecimento do seu ponto de corte, visando assegurar a sua eficácia no diagnóstico da cisticercose bovina.

**Palavras-Chave:** cisticercose bovina, soros-controle, Elisa, padronização.

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF DIFFERENT CONTROL-SERA GROUP IN THE BOVINE CYSTICERCOSIS DIAGNOSIS EMPLOYING THE ELISA TEST

An Elisa assay was carried out to analyze bovine serum samples. The samples were constituted by 80 sera from bovine with cysticercosis, either naturally and experimentally infected, 60 samples which were negative for cysticercosis, and 10 which were positive for other pathologies. *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* total antigens were used in the anti-cysticercosis antibody determinations. The test displayed low sensitivity and was deficient for the diagnosis of animals destined to the slaughterhouse, which often presents subclinical infections. However, for experimentally infected animals, sensitivity was considerably improved. The test can still be considered useful for the differentiation between cysticercosis and other diseases, due to its high specificity rate, from 81.4 to 100%, specially

<sup>1</sup> Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Email: pintopsa@ufv.br

<sup>2</sup> Instituto Mineiro de Agropecuária, Vila Giantetti, 35, Viçosa-MG.

<sup>3</sup> Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos – CPPI, Piraquara-PR.

when the negative sera were provenient from animals raised under controlled conditions. The selection of control sera for the cut-off calculation also interfered in the Elisa performance. When sera of animals raised under isolation was used for the cut-off calculation, sensitivity was high. However, when cut-off considered all the negative control sera, i.e., a non-controlled scenario, the test failed to identify the true cysticercosis-positive samples. It is concluded that the control serum selection is of utmost importance in the standardization of the Elisa test, especially in the establishment of the cut-off value, in order to assure its efficacy in the diagnosis of cysticercosis.

**Key words:** bovine cysticercosis, control sera, Elisa, standardization

## INTRODUÇÃO

A cisticercose é uma doença caracterizada pelo desenvolvimento da forma larvar da *Taenia saginata* em tecidos musculares do bovino, provocando prejuízos à pecuária de corte e riscos à saúde pública, uma vez que animal altamente parasitado pode ter a carcaça condenada em matadouros e constituir fonte de infecção para a teníase em seres humanos. O diagnóstico desta doença geralmente é feito durante o abate dos bovinos, por meio da observação de lesões no exame *post mortem*, que apresenta algumas limitações (Rodrigues, 1993), abrindo espaço para a utilização de testes sorológicos, como o ensaio de imunoadsorção enzimática – Elisa (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Durante o abate, algumas lesões podem passar despercebidas, levando a resultados falso-negativos, uma vez que as peças do animal abatido não podem ser examinadas minuciosamente, dada a necessidade de evitar a descaracterização comercial da carne, quando não há suspeita da doença. A freqüente ocorrência discreta da doença nos bovinos, com a presença de poucos cisticercos, também compromete o desempenho do respectivo exame.

Testes sorológicos como o Elisa devem ser estudados a fim de auxiliar nos exames *ante mortem* e *post mortem* dos bovinos, de modo a favorecer o controle da cisticercose, contribuindo para evitar os conhecidos prejuízos (Murrel *et al.* 1986).

O desempenho dos testes sorológicos depende do perfil da resposta imune dos animais infectados (Ferrer *et al.*, 2003).

Segundo Gallie & Sewell (1974a), uma falha no desenvolvimento de uma resposta humoral forte em bezerros pode dificultar o diagnóstico sorológico da cisticercose nesta categoria de animais no campo. Mas a idade do hospedeiro não é o único fator envolvido no

desenvolvimento da resposta imune. Gallie & Sewell (1974b) relatam que parece haver uma complexa relação entre a idade do bezerro na primeira infecção, o volume da dose infectante, o intervalo de tempo entre infecções sucessivas e o grau de resistência desenvolvido e mantido por estes animais.

Smith *et al.* (1991) demonstraram que o nível de anticorpos anti-*T. saginata* detectado pelo teste Elisa estava diretamente relacionado à dose de desafio com ovos infectantes e ao número de cisticercos estabelecidos em animais infectados experimentalmente. Apesar da relação direta entre dose infectante e absorvância, observou-se um aumento definido no nível de IgG detectável, entre 40 e 60 dias após a infecção, na maioria dos grupos testados. Em outra ocasião, Kyvsgaard *et al.* (1991) verificaram que a magnitude da resposta de anticorpos usando Elisa estava mais ou menos correlacionada ao número de cistos encontrados nas carcaças durante o abate.

O teste Elisa vem sendo utilizado no diagnóstico das cisticercoses em seres humanos, em suínos e bovinos, com poucos registros de sua aplicação nesses últimos, carecendo de protocolos padronizados para esta espécie, que permitam esclarecer a sua eficiência no diagnóstico da doença.

Esta pesquisa teve o objetivo de avaliar o desempenho do teste Elisa no diagnóstico da cisticercose bovina, de acordo com os tipos de antígenos e os grupos de soros-controle utilizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 soros de bovinos infectados experimentalmente com cerca de  $1 \times 10^4$  ovos de *T. saginata* por animal, 60 soros obtidos de animais com

cisticercose discreta (infecção natural) com até dois cisticercos vivos ou calcificados por animal, identificados na rotina de inspeção *post mortem* em matadouros, por meio de cortes específicos na musculatura; cinco soros de bovinos negativos para cisticercose, mantidos confinados em local isolado, sem contato com a pastagem e com alimentação controlada desde o nascimento, e 55 soros de bovinos considerados negativos na rotina de inspeção *post mortem*. Também foram estudadas eventuais reações cruzadas em dez soros de bovinos naturalmente infectados com actinomicose (n= 2), actinobacilose (n=1), fasciolose (n=1) diagnosticados na rotina de inspeção *post mortem* em matadouro e de bovinos infectados experimentalmente com *Anaplasma marginale* (n=3), *Babesia sp.* (n=2) e infecção mista por *A. marginale* e *B. bovis* (n=1).

Os antígenos totais de *T. crassiceps* e *T. solium* foram preparados conforme metodologia utilizada por Pinto *et al.* (2000) e utilizados no teste Elisa, de acordo com as melhores condições analíticas que permitiram a diferenciação entre soros-controle positivos e negativos definida por Monteiro (2004).

Visando a definição da positividade e negatividade dos soros, foram determinados os pontos de corte (*cut-off*), representados pela soma da densidade óptica (DO) média obtida em análise dos soros-controle negativos mais dois desvios-padrão. O ponto de corte 1 foi calculado a partir da DO média obtida em análise dos soros negativos de animais criados sob confinamento juntamente com soros de bovinos considerados negativos na inspeção *post mortem*. O ponto de corte 2 foi calculado utilizando a DO média obtida apenas com os soros oriundos de animais confinados.

O desempenho do teste Elisa nas diferentes

condições analíticas foi determinado pela taxa de sensibilidade e especificidade, a partir da frequência de positividade e negatividade da doença, organizada em tabelas de contingência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada grupo de soros-controle, considerando os dois pontos de corte estabelecidos para esta pesquisa, os resultados das reações obtidas no teste Elisa são apresentados na Tabela 1.

Exceto na análise dos soros-controle do grupo 1 (bovinos experimentalmente infectados), utilizando o ponto de corte 1, os demais resultados mostraram que os antígenos de *T. crassiceps* e de *T. solium* apresentaram reatividades semelhantes, não influenciando na variação de reação imunológica, quando se trocaram apenas os grupos de soros-controle (Tab. 1).

Foram utilizados diferentes grupos de soros-controle, permitindo assim uma análise mais ampla dos resultados obtidos, visto que o teste Elisa pode sofrer variação em virtude de diversas situações, como infecção discreta ou maciça, presença maior ou menor de reações inespecíficas e variação do perfil da resposta imune em diferentes estágios da doença (Smith *et al.*, 1990).

Analisando o comportamento dos soros-controle positivos no teste Elisa, percebe-se, pela Tabela 1, que o número de reações falso-negativas é muito elevado quando se consideram os soros de animais positivos no exame *post mortem* (Grupo 2), considerando os dois pontos de corte. Por isso, o teste Elisa mostrou sensibilidade muito baixa ao considerar este grupo de soros-controle positivos, discordando muito dos resultados obtidos quando tais soros-controle foram oriundos de animais infectados experimentalmente

Tabela 1. Frequência de reações positivas (Pos) e negativas (Neg) para cisticercose no teste Elisa envolvendo os diferentes grupos de soros e os antígenos totais de larvas de *T. solium* (T-sol) e de *T. crassiceps* (T-cra), segundo os pontos de corte 1 e 2

Grupos de soros*	Ponto de corte 1				Ponto de corte 2			
	T-sol		T-cra		T-sol		T-cra	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
1	17	3	7	13	18	2	18	2
2	2	58	3	57	11	49	12	48
3	1	9	0	10	1	9	1	9
4	1	54	4	51	7	48	12	43
5	0	5	0	5	0	5	0	5

\*1: soros de bovinos infectados experimentalmente, 2: soros de bovinos positivos na inspeção *post mortem*, 3: soros de bovinos com outras patologias, 4: soros de bovinos negativos na inspeção *post mortem*, 5: soros de bovinos criados em confinamento.

(Grupo 1). Este desempenho do teste Elisa também pode ser visualizado na Tabela 2, onde se vê que o valor da sua sensibilidade se mostrou muito maior no grupo 1 em comparação com o grupo 2. Esta diferença pode ser explicada pela leve resposta imunológica dos animais do grupo 2, que apresentaram infecção discreta, geralmente com dois cisticercos, no máximo, aproximando-se do perfil da resposta dos negativos. Os bovinos infectados experimentalmente (Grupo 1) receberam uma alta dose de ovos do parasita, o que resultou numa resposta imunológica mais intensa, devido à carga parasitária mais elevada, manifestando-se a infecção maciça, perfil patológico confirmado após a necropsia dos animais do grupo 1, infectados, por via oral, com ovos de *T. saginata*.

Confrontando o resultado de sensibilidade, 37,5%, obtido por Geerts *et al.* (1981), que também empregou antígeno de *T. crassiceps* com o desta pesquisa, 12,5% a 37,5%, verifica-se um baixo desempenho do teste no que se refere à detecção de animais positivos criados em condições de menor controle da doença.

Porém em condições controladas por infecção experimental, observou-se uma nítida elevação da sensibilidade do teste Elisa, chegando a 90%, e mostrando-se útil na detecção da cisticercose extensa.

Quanto aos soros de animais com outras patologias (Grupo 3), não foram observadas reações cruzadas dos antígenos com soros de animais portadores de actinobacilose, actinomicose e fasciolose. Entretanto, observou-se uma reação positiva no soro de animal infectado por *Babesia* sp., quando se utilizou o antígeno de *T. Solium*, e outra do soro de bovino com anaplasmosose

e o antígeno de *T. Crassiceps*, mas esta última foi revelada apenas no ponto de corte 2. Como o teste foi realizado apenas uma vez e o número de amostras foi limitado, ensaios adicionais envolvendo maior quantidade de soros de bovinos com a mesma patologia devem ser realizados, para se inferir sobre a existência de reação cruzada entre a cisticercose e a babesiose ou a anaplasmosose. Do mesmo modo, pondera-se ainda o baixo número de amostras de soros das outras patologias testadas.

Em relação aos soros-controle negativos (Grupos 4 e 5), nota-se que houve reações falso-positivas apenas com os soros de animais detectados como negativos no exame anátomo-patológico (Grupo 4), o que pode ser atribuído a reações inespecíficas, mais comuns em bovinos criados em condições não controladas. Entretanto, deve-se considerar a possibilidade da presença de animais falso-negativos nesse grupo, devido a baixa sensibilidade do exame anátomo-patológico, que foi o utilizado na identificação do perfil dos soros-padrão.

Quanto à especificidade (Tab. 3), observou-se desempenho satisfatório para ambos os antígenos. A especificidade obtida aproxima-se da atingida por Geerts *et al.* (1981) para o antígeno total de larva de *T. Crassiceps* (95,7%), reafirmando que o teste Elisa é um método de alto poder discriminatório entre a cisticercose e outras doenças, com baixa taxa de reações falso-positivas. Entretanto, os resultados obtidos contrariam os de Kyvsgaard *et al.* (1991) que consideraram que a especificidade do teste Elisa foi a principal dificuldade para seu emprego no diagnóstico individual.

Tabela 2. Sensibilidade (%) do teste Elisa dos soros positivos de bovinos infectados experimentalmente (1), de animais examinados na inspeção *post mortem* (2) e de ambos os grupos (1+2), considerando os pontos de corte 1 e 2 para os antígenos totais de larvas de *T. solium* (T-sol) e de *T. crassiceps* (T-cra)

Grupos de Soros*	Ponto de corte 1		Ponto de corte 2	
	T-sol	T-cra	T-sol	T-cra
1	85	35	90	90
2	3,3	5	18,3	20
1+2	23,7	12,5	36,2	37,5

\*1: soros de bovinos infectados experimentalmente, 2: soros de bovinos positivos à inspeção *post mortem*.

Tabela 3. Especificidade (%) do teste Elisa com todos os soros negativos (4+5) e com soros de bovinos criados sob confinamento (5), considerando os pontos de corte 1 e 2, para os antígenos totais de larvas de *T. solium* (T-sol) e de *T. crassiceps* (T-cra)

Grupos de Soros*	Ponto de corte 1		Ponto de corte 2	
	T-sol	T-cra	T-sol	T-cra
4+5	97,1	94,3	88,6	81,4
5	100	100	100	100

\*4: soros de bovinos negativos à inspeção *post mortem*, 5: soros de bovinos criados em confinamento.

Na avaliação do desempenho do teste, decidiu-se também por separar a análise dos resultados utilizando dois diferentes pontos de corte, ou seja, dois grupos distintos de soros-controle negativos.

Observou-se que o ponto de corte 1 (todos os soros-controle negativos) foi mais elevado que o 2 (somente os soros-controle negativos de animais em confinamento). Isto aconteceu, possivelmente, devido à maior ocorrência de reações inespecíficas dos soros de animais negativos na inspeção *post mortem* (Grupo 4), que foram considerados no cálculo do ponto de corte 1.

Assim sendo, o ponto de corte 1 pode ser visto como resultado de uma situação menos controlada de soros-controle negativos. O ponto de corte 2, por sua vez, refere-se a uma condição mais controlada, pois foram empregadas para seu cálculo apenas as DO obtidas com soros de animais criados em confinamento (Grupo 5), em condições controladas de alimentação e criação, situações estas que reduzem, expressivamente, o risco desses bovinos serem acometidos pela cisticercose ou outras doenças.

Percebeu-se um aumento da ocorrência de reações inespecíficas com ambos os antígenos estudados ao estabelecer o ponto de corte com os soros de animais negativos ao exame anátomo-patológico, comportamento este desfavorável do ponto de corte 2 em relação ao 1. Embora tais reações indiquem deficiências no teste Elisa ao utilizar o ponto de corte 2, verifica-se que a redução das taxas de especificidade (Tab. 3) não foi tão expressiva, evidenciando a grande maioria das verdadeiras reações negativas.

O número de reações falso-negativas com os soros de animais positivos no exame *post mortem* (Grupo 2) também sofreu ligeira queda, quando foram comparados o ponto de corte 1 e o 2. Assim, a vantagem do ponto de corte 2 ficou evidente, percebendo-se um nítido aumento da sensibilidade do teste com relação a ambos os grupos de soros-controle positivos. O ponto de corte 2 garantiu, assim, melhor detecção de animais positivos, até mesmo grande parte dos moderadamente infectados. Ainda, assim, verificaram-se baixas taxas de sensibilidade, de 12,5% a 37,5%, para a detecção de cisticercose discreta (Grupo 2).

Verificou-se uma queda da especificidade do teste do ponto de corte 1 para o 2, embora a do segundo ainda se mantivesse alta. A grande variação de DO dos soros de animais negativos no exame *post mortem*, aliada ao ponto de corte menor, aumenta a chance de aparecerem resultados

falso-positivos, o que reduziu a especificidade do teste na condição do ponto de corte 2.

Diante do exposto, percebe-se que o esquema de padronização do teste Elisa pode variar de acordo com o interesse de sua aplicação. Por exemplo, para triagem (levantamento epidemiológico) ou liberação da carne para o consumo de seres humanos, diretamente ou por meio de aproveitamentos condicionais, como o congelamento, priorizando a sensibilidade ou a especificidade do teste. Neste aspecto, a padronização deverá considerar um certo desempenho do teste Elisa que contemple um equilíbrio desejado entre sensibilidade e especificidade.

Como se pode observar, em testes de padronização, é de grande importância a seleção adequada de soros-controle, principalmente para o estabelecimento de um ponto de corte. Seguindo a mesma conclusão, Smith *et al.* (1991) relataram que os baixos níveis de anticorpos produzidos nas infecções leves muitas vezes dificultam a seleção de um ponto de corte adequado, bem como a própria interpretação dos resultados em testes sorológicos, tal como o Elisa.

Conforme Smith *et al.* (1990), o desenvolvimento de anticorpos contra a cisticercose depende, no mínimo, da intensidade da infecção estabelecida e, provavelmente, também da fase de infecção em que se encontram os animais testados. Os mesmos autores argumentaram que a aplicabilidade do teste Elisa em soros de animais naturalmente infectados é questionável, devido ao elevado número de resultados falso-negativos. A maioria dos bovinos com cisticercose exibiu grau de infecção leve, com baixa produção de anticorpos (Geerts *et al.*, 1981), dificultando assim a detecção da doença nesses animais, como pôde ser constatado neste estudo. Verificou-se alto número de reações falso-negativas com soros de animais detectados como positivos pela inspeção visual, após cortes específicos na musculatura.

## CONCLUSÕES

A seleção de soros-controle utilizados em ensaios do teste Elisa é importante na avaliação de bovinos soropositivos ou negativos para a cisticercose. Tais grupos de soros também influenciam no estabelecimento do ponto de corte a ser adotado, que deve ser escolhido de acordo com o propósito do diagnóstico, como levantamento epidemiológico ou diagnóstico em

matadouros. As situações mais controladas dos animais fornecedores dos soros-controle negativos (confinamento) aumentam a sensibilidade do teste Elisa, mas ainda não amplia a capacidade do desta prova de detectar a cisticercose na sua forma discreta, por meio dos dois antígenos estudados. Apesar da especificidade estar reduzida, nesse caso esta redução é discreta, confirmando a capacidade do teste em discriminar os animais positivos dos negativos, na maioria das vezes. O ensaio mostrou elevada eficácia no diagnóstico da cisticercose bovina intensa (infecção experimental), sobretudo ao utilizar o antígeno de larva de *T. solium*.

## AGRADECIMENTO

FAPEMIG pelo financiamento.

## REFERÊNCIAS

- Ferrer E, Benitez L, Foster-Cuevas M, Bryce D, Wamae LW, Onyango-Abuje JA, Garate T, Harrison LJS & Parkhouse RME (2003) *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. *Veterinary Parasitology* 111:83-94.
- Gallie GJ & Sewell MMH (1974a) The serological response of calves infected neonatally with *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*). *Tropical Animal Health Production* 6:173-177.
- Gallie GJ & Sewell MMH (1974b) The serological response of three month old calves to infection with *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) and their resistance to reinfection. *Tropical Animal Health Production* 6:163-171.
- Geerts S, Kumar V, Ceulemans F & Mortelmans J (1981) Serodiagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in experimentally and naturally infected cattle by enzyme linked immunosorbent assay. *Research Veterinary Science* 30:288-293.
- Kyvsgaard NC, Ilsøe B, Henriksen SA, Feld NC & Nansen P. (1991) Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of *Taenia saginata* cysticercosis in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica* 32:233-241.
- Monteiro LL (2004) Antígenos de larvas de *T. crassiceps* e *T. solium* em teste ELISA para diagnóstico da cisticercose bovina. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 80p.
- Murrell KD, Fayer R & Dubey JP (1986) Parasitic organisms. *Advances of Meat Research* 2:311-376.
- Pinto PSA, Vaz AJ, Germano PML & Nakamura PM (2000) Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *Veterinary Parasitology* 88:127-130.
- Rodrigues LVC (1993) Inspeção sanitária e critério de julgamento da cisticercose bovina calcificada. Infecção leve. *Ciência Rural* 23(3):339-344.
- Smith HJ, Snowdon KE, Gregory D & Finley GG (1990) Assessment of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay using a *Taenia hydatigena* fraction antigen in the diagnosis of cysticercosis in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research* 54:299-300.
- Smith HJ, Snowdon KE & Finlay R.C (1991) Serological diagnosis of cysticercosis by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay in experimentally infected cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research* 55:274-276.