

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

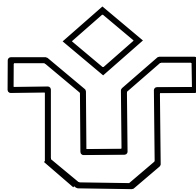
**INFLUÊNCIA DOS ACHADOS DO LÍQUIDO  
CEFALORRAQUEANO NO DESEMPENHO DO TESTE  
DE ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA  
NEUROCISTICERCOSE**

**CRISTIANE DA SILVA CASANOVA**

**Profa. Dra. Marzia Puccioni Sohler**  
ORIENTADORA

**Rio de Janeiro, RJ – Brasil**

**2006**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

Dissertação apresentada ao término do Curso de Pós-Graduação Stricto-Sensu em Neurologia, Área de Concentração Neurociências, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2006

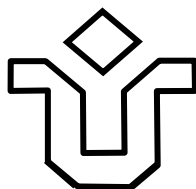
616.8 Casanova, Cristiane da Silva,  
Influência dos achados do líquido cefalorraqueano no desempenho do teste de elisa para o diagnóstico da neurocisticercose. Rio de Janeiro, 2006.

IX, 59f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marzia Puccioni Sohler.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Mestrado em Neurologia, 2006.

1. Neurocisticercose. 2. Líquido Cefalorraqueano. 3. Ensaio imunoenzimático. I. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. II. Sohler, Marzia Puccioni.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**INFLUÊNCIA DOS ACHADOS DO LÍQUIDO  
CEFALORRAQUEANO NO DESEMPENHO DO TESTE  
DE ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA  
NEUROCYSTICERCOSE**

Por

**CRISTIANE DA SILVA CASANOVA**

Dissertação de Mestrado

**BANCA EXAMINADORA**

Professora Dra. Marzia Puccioni Sohler

Professor Dr. José Mauro Peralta

Professora Dra. Lucia Marques Alves Vianna

Conceito:.....

Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 2006

“...Sonhos são como deuses: quando  
não se acredita neles, deixam de existir...”  
Paulinho Mosca

Aos meus pais  
Manoel e Dioneia  
pelo apoio e incentivo na  
realização de meus objetivos

## AGRADECIMENTOS

- ▶ A Deus, pelo meu viver.
- ▶ À minha família pelo incessante apoio; em especial aos meus pais pela confiança, carinho, dedicação e amor depositados na realização do caminho por mim escolhido.
- ▶ À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marzia Puccioni, pela excelente orientação e incansável apoio neste estudo e pela confiança em meu trabalho.
- ▶ Aos Professores Dr. José Mauro Peralta e Dr<sup>a</sup> Regina Helena Saramago Peralta (Laboratório de Sorologias/Instituto de Microbiologia/UFRJ) pelo apoio e colaboração neste estudo.
- ▶ Ao Luis Cláudio Farias, à Luciana Ferreira Dimas e ao Reizer Reis Gonçalves (Laboratório de LCR/SPC/HUCFF/UFRJ) na colaboração deste estudo.
- ▶ Ao Dr. Carlos Otávio Brandão e ao Dr. Ricardo Canuto Benesi (diretores do Laboratório Neurolife) pelo apoio, incentivo, uso das dependências de seu laboratório, coleta de dados para a execução deste estudo e pela confiança em mim depositada.
- ▶ Às biólogas Celina de Oliveira, Maria José de Sousa Ponce Ribeiro, Célia Maria Teixeira Limpi e Maria da Glória Augusto e Gaby Jéssica Rangel (aluna de Farmácia) funcionárias do Laboratório Neurolife pela colaboração, incentivo, amizade e companheirismo.
- ▶ À Dra. Regina Alvarenga pela incansável perseverança no sucesso de nosso curso de Mestrado.
- ▶ À Prof<sup>a</sup> Lúcia Marques Vianna pelo eterno e terno carinho; pelas excelentes críticas e pela confiança em nosso sucesso.

## RESUMO

A neurocisticercose (NC) é uma afecção parasitária comum do sistema nervoso central humano (SNC) causada pela larva da *Taenia solium*, o *Cysticercus cellulosae*. O objetivo deste estudo foi avaliar se o exame do líquido cefalorraqueano (LCR) poderia influenciar na reatividade do teste de ELISA utilizado para NC. Amostras de LCR de 109 pacientes foram analisadas e classificadas em três grupos, de acordo com as manifestações neurológicas e reatividade do teste de ELISA para NC no LCR. Grupo A, 18 pacientes com enfermidades neurológicas compatíveis com NC e reatividade do teste ELISA para NC no LCR; grupo B, 50 pacientes com enfermidades neurológicas não compatíveis com NC e reatividade do teste ELISA para NC no LCR; grupo C, 41 pacientes com enfermidades neurológicas não compatíveis com NC e na ausência de reatividade do teste de ELISA para NC no LCR. A análise do LCR do grupo A foi compatível com NC. O grupo B apresentou maiores níveis de pleocitose, de hemácias no LCR, hiperproteinorraquia, presença de anticorpos para outros agentes etiológicos em comparação aos grupos A e C ( $p < 0.05$ ). Os dados indicam que o processo inflamatório e os elevados níveis de concentração da proteína no LCR podem influenciar na ocorrência de reações falso positivas de ELISA para NC.

**PALAVRAS-CHAVE:** Líquido cefalorraqueano, ensaio imunoenzimático, neurocisticercose.



## ABSTRACT

Neurocysticercosis (NC) is a common parasitic disease of the human central nervous system (CNS) caused by the larval stage of the *Taenia solium*, the *Cysticercus cellulosae*. The objective of this study was to evaluate if the cerebrospinal fluid (CSF) analysis may influence the reactivity of the ELISA test for NC. CSF samples of 109 patients were analyzed and classified in three groups, according to the neurological manifestations and the reactivity in ELISA testing in CSF for NC: group A, 18 patients with neurological diseases compatible with NC and reactive ELISA in CSF for NC; group B, 50 patients with neurological diseases non-compatible with NC and reactive ELISA for NC; group C, 41 patients with neurological diseases non-compatible with NC and non-reactive ELISA in CSF for NC. The CSF analysis of the group A was compatible with NC. The group B in comparison to the groups A and C presents higher frequency and levels of pleocytosis, red blood cells in CSF, protein concentration and immunological reactive test for other etiological agents ( $p < 0.05$ ). Based on the present data, we suggest that the inflammatory process and high protein concentration may determine false positive reactions in the ELISA test for NC in the CSF.

**KEY WORDS:** Cerebrospinal fluid, enzyme linked immunosorbent assay, neurocysticercosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCS	Centro de Ciências e da Saúde
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
HAI	Hemaglutinação indireta
HTTP	Hiper Text Transfer Protocol
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
HUGG	Hospital Universitário Gafrèe e Guinle
IFI	Imunofluorescência indireta
LCR	Líquido cefalorraqueano
NC	Neurocisticercose
NM	Nanômetro
PGNEURO	Pós – Graduação em Neurologia
RM	Ressonância magnética
SNC	Sistema nervoso central
TC	Tomografia computadorizada
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNIRIO	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
WB	Western Blot
WWW	World Wide Web

# SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
2.1 <i>Taenia solium</i> :	4
2.1.1 Biologia	4
2.1.2 Ciclo Biológico	7
2.2 Neurocisticercose:	9
2.2.1 Epidemiologia e aspectos clínicos	9
2.2.2 Diagnóstico	11
2.2.3 Exame de imagem	13
2.2.4 O exame do Líquido Cefalorraqueano	13
2.2.5 Métodos imunológicos	16
3. OBJETIVOS	18
4. METODOLOGIA	19
5. RESULTADO	24
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
9. FIGURAS	
Figura 1 (a). <i>Taenia solium</i> ( <a href="http://lt.wikipedia.org/wiki/Plok">http://lt.wikipedia.org/wiki/Plok</a> ; consulta em 09/08/2006)	5

Figura 1 (b). <i>Taenia solium</i> : A – escólex; B – colo; C – estróbilo ( <a href="http://lt.wikipedia.org/wiki/Plok">http://lt.wikipedia.org/wiki/Plok</a> ; consulta em 09/08/2006)	5
Figura 2. Vista tridimensional de escólex de <i>Taenia solium</i> , ressaltando o rostelo e as ventosas ( <a href="http://www.stanford.edu/.../Taeniasis/taenia.jpg">www.stanford.edu/.../Taeniasis/taenia.jpg</a> ; consulta em 09/08/2006)	5
Figura 3(a). <i>Taenia solium</i> : Proglótides grávidas evidenciando as ramificações uterinas (consulta em 09/08/2006)	5
Figura 3(b). <i>Taenia solium</i> : Proglótides maduras evidenciando os orifícios genitais ( <a href="http://www.ieev.uma.es/parasitos/Cestodos/tenia95.jpg">http://www.ieev.uma.es/parasitos/Cestodos/tenia95.jpg</a> ; consulta em 09/08/2006)	6
Figura 3(c). <i>Taenia solium</i> : Proglótides maduras evidenciando as estruturas anatômicas ( <a href="http://www.simulium.bio.uottawa.ca/.../images/platyhe6.gif">http://www.simulium.bio.uottawa.ca/.../images/platyhe6.gif</a> ; consulta em 09/08/2006)	6
Figura 4. Ovo de <i>Taenia solium</i> visualizado em exame parasitológico ( <a href="http://www.saudeanimal.com.br/imagens/ovo_tenia.jpg">http://www.saudeanimal.com.br/imagens/ovo_tenia.jpg</a> ; consulta em 09/08/2006)	8
Figura 5 (a). Ciclo biológico da <i>Taenia solium</i> (exemplo 1) ( <a href="http://cni.inta.gov.ar/.../Taenia%20Solium.jpg">http://cni.inta.gov.ar/.../Taenia%20Solium.jpg</a> ; consulta em 09/08/2006)	9
Figura 5 (b). Ciclo biológico da <i>Taenia solium</i> (exemplo 2) ( <a href="http://www.fihu-diagnostico.org.pe/.../julago00/176.gif">www.fihu-diagnostico.org.pe/.../julago00/176.gif</a> ; consulta em 09/08/2006)	9
Figura 6. Corte histológico transversal de <i>Cysticercus cellulosae</i> ( <a href="http://www.ulb.ac.be/.../teniasoliumcisticerque.jpg">http://www.ulb.ac.be/.../teniasoliumcisticerque.jpg</a> ; consulta em 09/08/2006)	8
Figura 7. Pesquisa de bandas oligoclonais IgG	16
Figura 8. Câmara de Fuchs-Rosenthal	21
Figura 9. Câmara de sedimentação celular (câmara de “suta”).	21
Figura 10. Exemplo de placa de ELISA	23

Figura 11. Esquema do método de ELISA	23
Figura 12. Índice relativo de ELISA para neurocisticercose nos grupos A, B e C	27
Figura 13. Curva ROC da concentração de proteínas de 18 pacientes com neurocisticercose (Grupo A)	28

## 10. QUADRO

Quadro 1. Critério Diagnóstico para NC (SOTELO <i>et al</i> , 1985)	11
Quadro 2. Critério Diagnóstico para NC (Del Brutto <i>et al</i> , 2001)	12
Quadro 3. Valores referenciais para o Quociente de Albumina	15

## 11. TABELAS

Tabela 1. Manifestações clínicas e classificação de 18 pacientes com diagnóstico de neurocisticercose (Grupo A)	24
Tabela 2. Resultados da análise laboratorial de amostras de LCR de pacientes com manifestações neurológicas e resultados positivos (Grupos A e B) ou negativos (Grupo C) do teste de ELISA para NC.	26

## 12. ANEXO 41

•Publicação em periódico: CASANOVA, C. S.; RIBEIRO, M. J. S. P.; GONÇALVES, R. R. *et al*. Influence of the cerebrospinal fluid laboratory parameters in the ELISA test for neurocysticercosis using a total cysticerci antigen. *Arq Neuropsiquiatr* 2006;64(1):55-59.

## 1. INTRODUÇÃO

A neurocisticercose (NC) é uma afecção parasitária comum do sistema nervoso central (SNC) humano causada pela forma larvária da *Taenia solium*, o *Cysticercus cellulosae*. A distribuição da doença é universal e constitui um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento onde as condições sanitárias são deficientes. O diagnóstico da NC permanece difícil devido às manifestações pleomórficas e não específicas da doença. Epilepsia, hidrocefalia, aumento da pressão intracraniana e cefaléia são as manifestações mais comuns associadas à NC. Além dos aspectos acima, a localização, o tamanho, o grau de desenvolvimento e de degeneração do parasita, a presença e a intensidade da resposta imune do hospedeiro corroboram para a apresentação não específica das manifestações clínicas da NC (MACHADO *et al*, 2002; SOTELO e DEL BRUTTO, 2002; VAZ e LIVRAMENTO, 2001).

A síndrome do líquido cefalorraqueano (LCR) na NC descrita por Lange (1940) (*apud* MACHADO *et al*, 2002), inclui a presença de pleocitose, eosinofilia e anticorpos anti-cisticercos para NC no LCR. Nas últimas décadas novos parâmetros diagnósticos, tais como exames de neuroimagem, estudos epidemiológicos e da barreira hemato-LCR foram incluídos para complementar o diagnóstico da NC. Assim, os critérios diagnósticos da NC são baseados nos dados clínicos, epidemiológicos, estudos de neuroimagem, da análise LCR, do soro e de métodos imunológicos (DEL BRUTTO *et al*, 2001).

Testes imunológicos para a verificação da presença de anticorpos e de antígenos de *Taenia solium* no soro e no LCR têm sido propostos para o diagnóstico laboratorial da NC

(DORNY *et al*, 2003; ITO *et al*, 1998; PROAÑO-NARVEZ *et al*, 2002). Contudo, a maioria deles possui valor limitado devido à baixa sensibilidade, especificidade e do desempenho do teste, os quais, também, dependem do número, da localização e do estágio de desenvolvimento do parasita (VAZ e LIVRAMENTO, 2001).

De acordo com dados publicados, o teste de ELISA apresenta baixos níveis de sensibilidade e especificidade na determinação de anticorpos anti-cisticercos no soro quando comparado com o teste Western Blot (WB), mas os valores aumentam até 97,6% e 98,9%, respectivamente, quando aplicado ao LCR (TSANG *et al*, 1989). Baseado nos valores de sensibilidade (98%) e especificidade (100%) do WB, o mesmo, é considerado atualmente como o melhor teste sérico imunológico disponível. Contudo, devido ao baixo custo e alta reprodutividade, o teste de ELISA é ainda amplamente utilizado como suporte para o diagnóstico da NC tanto no LCR como no soro (DORNY *et al*, 2003). Por outro lado, a sensibilidade e a especificidade do teste para NC deve ser baixa de acordo com a presença de lesão única, calcificação ou lesões afastadas do sistema ventricular (SOTELO e DEL BRUTTO, 2002).

Estudos recentes têm demonstrado reações falso-positivas do teste de ELISA para NC em amostras de LCR. Essa situação geralmente ocorre na presença de processos inflamatórios tais como neurotuberculose ou por causa de reações cruzadas a infecções por helmintos, tais como os do gênero *Echinococcus* (GEKELER *et al*, 2002; KATTI, 2002).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO

A principal característica de qualquer Primata tal qual o Homem é a curiosidade. Por assim dizer, a humanidade sempre teve a preocupação em desvendar a origem da vida, do Universo e da organização dos seres vivos em táxons. Com referência às doenças e seus agentes causadores não seria diferente. Portanto, a primeira referência na humanidade acerca da existência de cisticercos remonta de 380 a 375 a.C. com o filósofo Aristófanes o qual comparava-os ”a pequenas pedras que poderiam ser encontradas embaixo da língua de porcos” (*apud HAWK et al, 2005*). Em 1550, é descrita a necrópsia de um homem com cisticercos encontrados no corpo caloso (*apud HAWK et al, 2005*). As mesmas estruturas foram também encontradas aderidas à dura-máter de um paciente, em 1558, por Gessner e Rumler (*apud HAWK et al, 2005* ). Contudo, essas vesículas foram identificadas como parasitas apenas em 1686 por Redi e Malpighi (*apud HAWK et al, 2005*). Através de infecções pareadas do homem e do porco, Kuchenmeister em 1855 demonstrou que o cisticerco dá origem à tênia (*apud HAWK et al, 2005*). Ainda no século XIX outras contribuições ao estudo da NC foram demonstradas através de necrópsias cerebrais, meningite cisticercótica com acometimento da medula espinhal, hidrocefalia e obstrução do fluxo do LCR (*apud HAWK et al, 2005*).

Em 1881 foi descrito a primeira referência sobre NC no Brasil (*apud HAWK et al, 2005*).

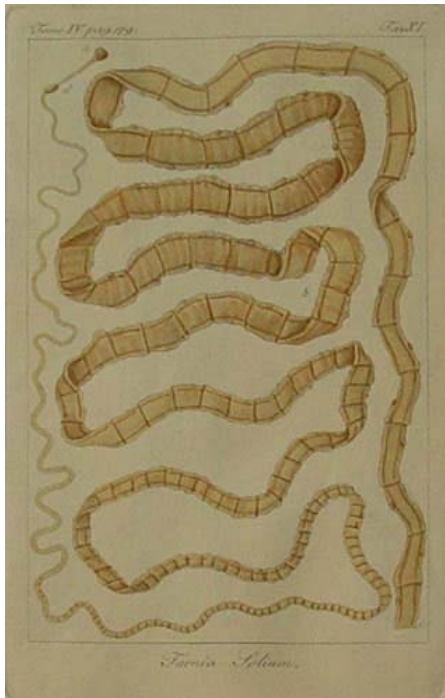
O século XX é marcado pelo desenvolvimento de técnicas, a princípio, sorológicas para a detecção de anticorpos anti-cisticercos. No Brasil, Lange (1940) utiliza a reação de fixação de complemento no LCR (*apud MACHADO et al, 2002*).



## **2.1 *Taenia solium*:**

### **2.1.1 Biologia**

Sistematicamente, a *Taenia solium* pertence ao phylum Platyhelminthes (do grego platy, chato, e helminthes, verme), à classe Cestoidea (do grego keston, cinto, e eidos, forma) ordem Cyclophyllidea, família Taeniidae e gênero *Taenia*. São endoparasitas obrigatórios. A forma adulta do parasita aloja-se na porção inicial do jejuno de seu hospedeiro. O corpo, em forma de fita, apresenta morfologia adaptada à vida parasitária: na região anterior, para fixação e adesão à mucosa do hospedeiro encontram-se estruturas características para sua adesão. A presença de segmentação do corpo (representada pelas proglótides), de um sistema reprodutor extraordinariamente desenvolvido, de hermafroditismo e da ausência de tubo digestivo constituem, ainda, elementos que caracterizam o parasitismo. Seus ovos são constituídos por embriões que possuem seis acúleos ou ganchos (embrião hexacanto ou oncosfera); a reprodução é sexuada com autofecundação e protandria; o corpo está dividido em escólex, colo e estróbilo (figuras 1 a e 1 b).

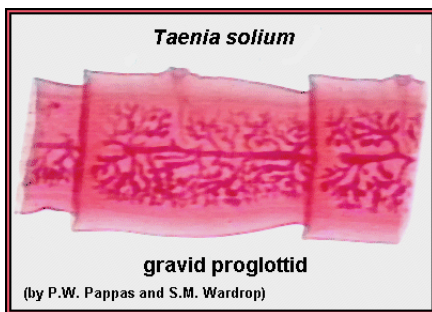


**Figura 1 (a).** *Taenia solium*  
(<http://lt.wikipedia.org/wiki/Plok>; consulta em 09/08/2006)

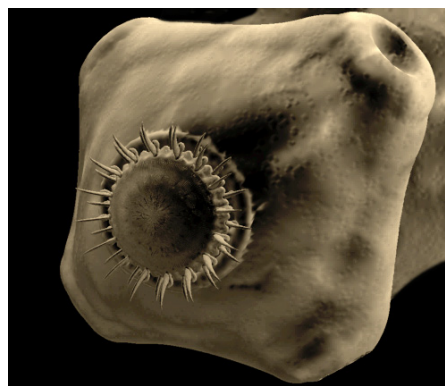


A B C  
|-----| |-----| |-----

**Figura 1 (b).** *Taenia solium*: A – escólex; B – colo; C – estróbilo  
(<http://lt.wikipedia.org/wiki/Plok>; consulta em 09/08/2006)



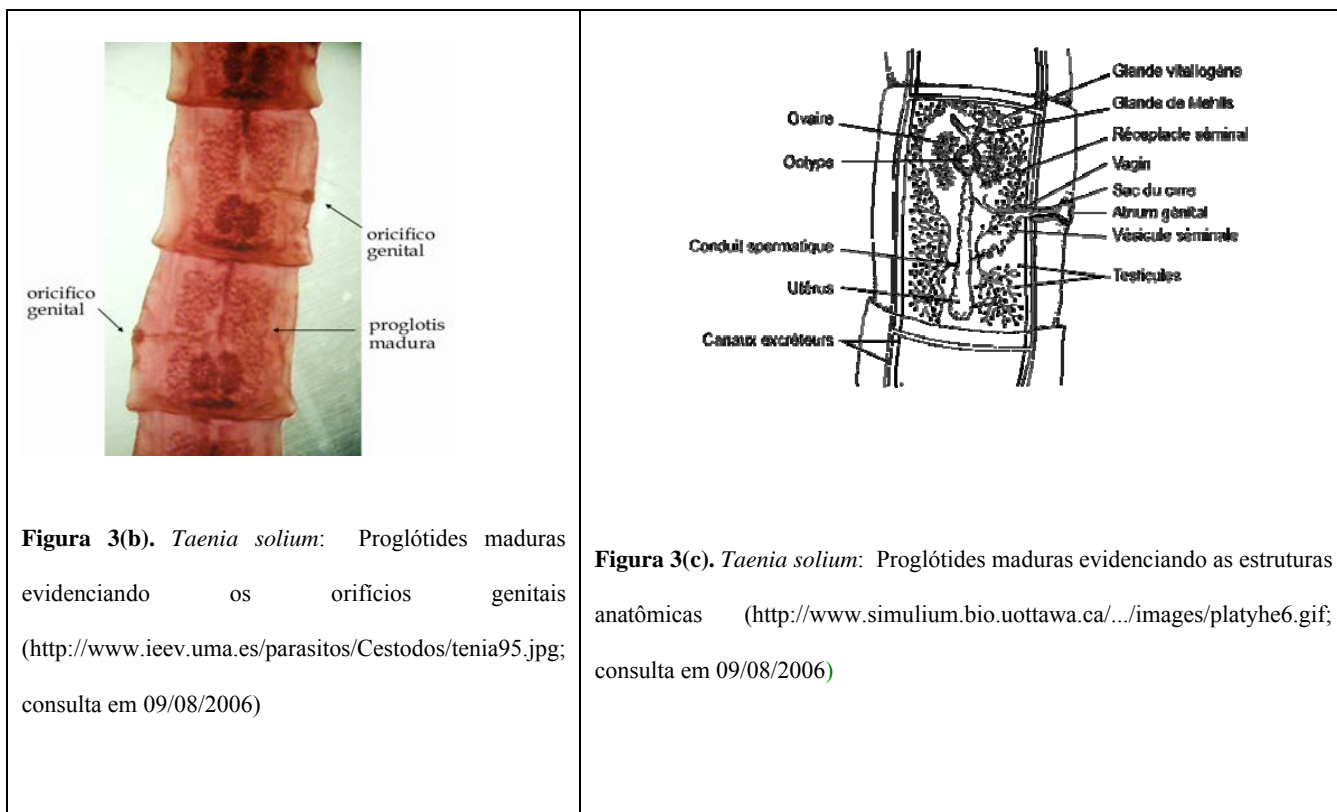
**Figura 3(a).** *Taenia solium*: Proglótides grávidas evidenciando as ramificações uterinas (consulta em 09/08/2006)



**Figura 2.** Vista tridimensional de escólex de *Taenia solium*, ressaltando o rostelo e as ventosas  
([www.stanford.edu/.../Taeniasis/taenia.jpg](http://www.stanford.edu/.../Taeniasis/taenia.jpg); consulta em 09/08/2006)

A escólex, medindo cerca de dois milímetros, é a porção anterior do parasita responsável pela adesão do mesmo à mucosa intestinal do hospedeiro. Constitui-se por dois pares de ventosas e dupla coroa de acúleos que podem variar de 24 a 32. Essa camada de acúleos é denominada de rostelo. Os acúleos, também, são estruturas que auxiliam na fixação do parasita (figura 2).

O colo compreende uma porção intermediária, alongada e delgada do parasita de onde surge o estróbilo; é a estrutura de crescimento do parasita. Nessa região não há segmentação nem estruturas nobres (figura 1 b).



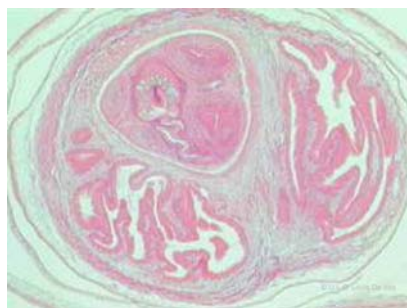
O estróbilo é constituído por proglótides (de 7 a 12 mm de comprimento e de 5 a 6 mm de largura) que são estruturas as quais alojam os órgãos sexuais da tênia. Esses últimos

estão representados por um útero com tubos longitudinais ramificados e numerosos testículos. O número de proglótides, pode variar de oitocentas a novecentas, sendo as jovens mais curtas e, as maduras e grávidas, alongadas (Figuras 3a, 3b e 3c). Essas estruturas são eliminadas para o meio externo através de um processo passivo denominado apólise. No meio ambiente, as proglótides grávidas podem liberar de trinta a cinquenta mil ovos (de 30 a 40  $\mu\text{m}$  de diâmetro); figura 4. Uma *Taenia solium* adulta mede, em geral, de 1,5 a 5 metros com uma longevidade aproximada de 25 anos (REY, 1991).

### **2.1.2 Ciclo Biológico**

O ciclo biológico da *Taenia solium* é complexo e envolve dois hospedeiros, o homem como único e definitivo hospedeiro da forma adulta e o porco, hospedeiro intermediário da forma larval do parasita (figura 5). O porco, através da pastagem e de hábitos coprofágicos ingere ovos viáveis e até proglótides grávidas inteiras vindo a desenvolver cisticercose. A ingestão de cisticercos pelo homem através da carne de porco mal cozida promove a aquisição de teníase. A auto-infestação decorrente do anti-perilitismo, da educação sanitária e de hábitos pessoais de higiene deficientes, e a hetero-infestação através da ingestão de água e alimentos contaminados por ovos do parasita são as principais causas de aquisição dessa complexa parasitose. Após a ingestão dos ovos, sua parede, de natureza quitinosa-calcária, sofre a ação dos sucos gástricos e no jejuno é liberado o embrião hexacanto que por via hematogênica, através de seus acúleos, poderá alcançar todos os tecidos e órgãos, onde desenvolver-se-á até a forma larval ou cisticerco (*Cysticercus cellulosae*; do grego, Kystic, de vesícula e Kerco, cacho; cellulosae devido a grande ocorrência no tecido subcutâneo); figura 6. No porco, ocorre a forma disseminada

da cisticercose devido ao eficiente estabelecimento da larva em seus tecidos. No homem, o *Cysticercus cellulosae* têm sido encontrado principalmente no SNC (ventrículos, meninges, córtex cerebral, núcleos da base e raramente na medula espinhal), músculos, pele, tecido celular subcutâneo, língua e globo ocular (retina, humor-vítreo, conjuntiva, órbita); devido à localização, à gravidade dos sintomas, ao elevado custo do tratamento, à hospitalização e de ser considerado um grave problema médico e de saúde pública, a NC é a forma mais estudada(VAZ e LIVRAMENTO, 2001; REY, 1991).



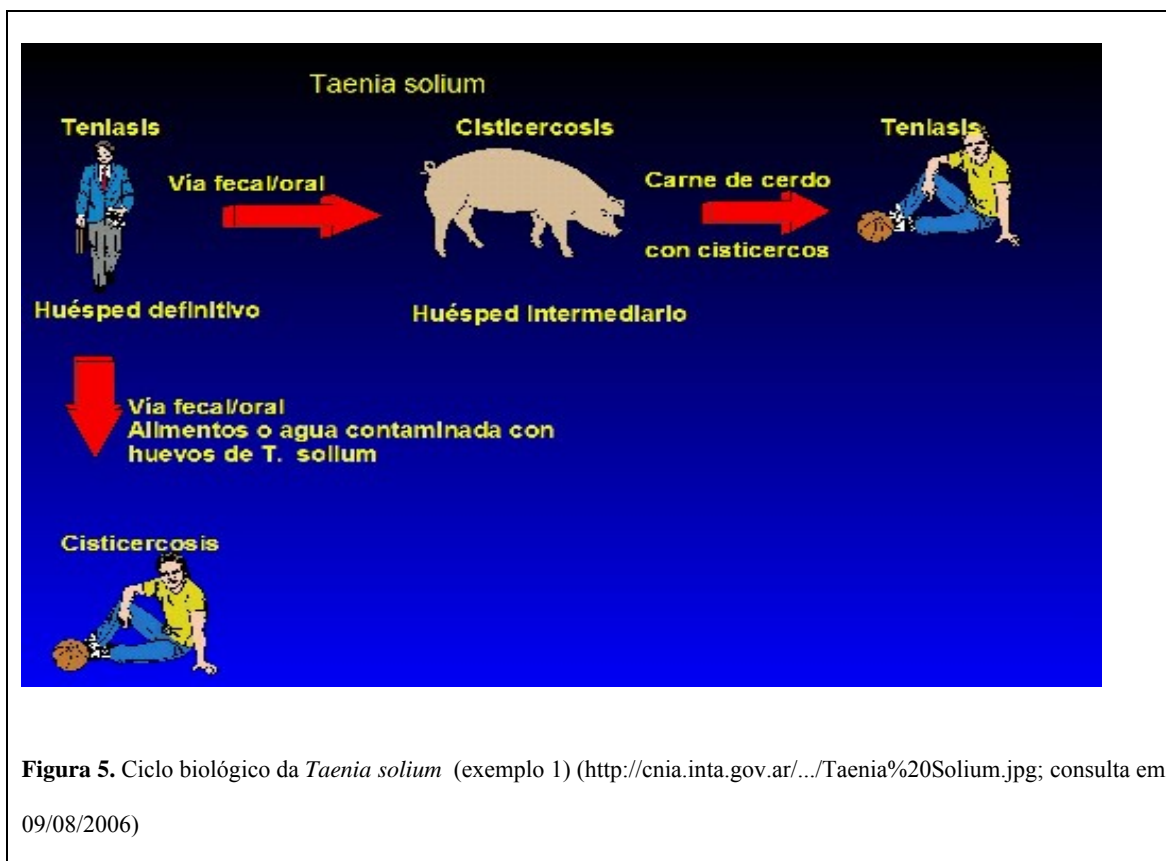
**Figura 6.** Corte histológico transversal de *Cysticercus cellulosae*

(<http://www.ulb.ac.be/.../teniasoliumcisticerque.jpg>; consulta em 09/08/2006)



**Figura 4.** Ovo de *Taenia sp* visualizado em exame parasitológico

([http://www.saudeanimal.com.br/imagens/ovo\\_tenia.jpg](http://www.saudeanimal.com.br/imagens/ovo_tenia.jpg); consulta em 09/08/2006)



## 2.2. Neurocisticercose:

### 2.2.1 Epidemiologia e aspectos clínicos

A NC é considerada um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento da América Central (em particular o México), África, Ásia e América do Sul, onde 12% da população é admitida para avaliação neurológica em centros especializados. No Brasil, estudos epidemiológicos apontam para a frequência de 0,2% a 7,5%, principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Goiás e Minas Gerais (VAZ e LIVRAMENTO, 2001). A alta incidência está relacionada com a ineficiência na educação sanitária e nos hábitos de higiene pessoal inadequados. É importante ressaltar, também, a

alta incidência de casos de NC nos países industrializados que recebem imigrantes de áreas endêmicas da doença como os Estados Unidos (DEL BRUTTO *et al*, 2001). Não há diferença quanto ao sexo e raça. A faixa etária atingida varia de 21 a 40 anos e corresponde àquela em fase produtiva. O tratamento, por vezes longo, necessita de vários dias de internação com elevado custo (VAZ e LIVRAMENTO, 2001). Além disso, a NC é responsável por mais de cinquenta mil mortes por ano no mundo (DEL BRUTTO *et al*, 2001).

As manifestações clínicas mais comuns relacionadas à NC são: convulsão, cefaléia, hidrocefalia e hipertensão intracraniana. É interessante ressaltar que a epilepsia adquirida em adultos, segundo a Liga Internacional contra Epilepsia, é a principal manifestação clínica de NC. Cerca de 70% dos pacientes com NC apresentam epilepsia (SOTELO *et al*, 2002). Estudos demonstram que as convulsões estão associadas com a presença de calcificações (*apud* SHET, 1998). A cefaléia pode ser um sinal de hipertensão intracraniana, de envolvimento vascular bem como de NC cisternal, parenquimatosa ou ventricular (WHITE JR, 2000). A hipertensão intracraniana, em geral, advém de hidrocefalia obstrutiva por cisticercos nos canais do fluxo do LCR. Vômitos, náuseas, vertigem, alterações visuais e distúrbios do nível de consciência são sintomas que podem estar presentes e indicar aumento da pressão intracraniana. A NC ocasiona, também, depressão, psicoses e problemas cognitivos como dificuldade de memorização (WHITE JR, 2000). A apresentação pleomórfica e não específica das manifestações clínicas é determinada pela localização, pelo tamanho, estágio de desenvolvimento, idade do parasita e pelas condições imunológicas do hospedeiro (VAZ e LIVRAMENTO, 2001).

### 2.2.2 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico da NC está relacionado à associação de dados clínicos e epidemiológicos, ao estudo de neuroimagem, ao estudo pareado do LCR e do soro (DEL BRUTTO *et al*, 2001).

Sotelo e cols. apresentaram em 1985 um critério relacionado às formas ativas e inativas de NC baseado em dados clínicos e tomográficos, além da análise do LCR (quadro 1).

**Quadro 1.** Critério Diagnóstico para NC (SOTELO *et al*, 1985)

<u>Formas Ativas NC</u>	<u>Formas Inativas NC</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aracnoidites</li> <li>• Hidrocefalia aguda</li> <li>• Cistos no parênquima</li> <li>• Infarto cerebral</li> <li>• Lesões císticas gigantes</li> <li>• Cistos intraventriculares</li> <li>• Cistos espinhais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcificações no parênquima</li> <li>• Hidrocefalias secundárias</li> </ul>

Em 2001, um critério mais completo foi proposto por Del Brutto e cols. para a NC. Esse critério associa a análise em conjunto dos aspectos clínicos, imunológicos e



epidemiológicos com estudo de neuroimagem e da utilização de métodos imunológicos aplicados ao LCR e ao soro:

**Quadro 2.** Critério Diagnóstico para NC (Del Brutto *et al*, 2001)

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Absoluto</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biópsia confirmatória</li> <li>• Imagem de cisto c/ escólex</li> <li>• Exame fundoscópico</li> </ul> </li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Maior</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lesões altamente sugestivas de NC no exame de imagem</li> <li>• EITB positivo no soro</li> <li>• Resolução de lesões císticas após tratamento com drogas cisticidas</li> <li>• Resolução espontânea de lesões únicas</li> </ul> </li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Menor</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• - Lesões compatíveis com NC em exames de imagem</li> <li>• - Manifestações clínicas sugestivas de NC</li> <li>• - ELISA reagente no LCR</li> <li>• - Cisticercose fora do SNC</li> </ul> </li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Epidemiológico</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• - Evidência de contato familiar com infecção por <i>Taenia solium</i></li> <li>• - Indivíduos com procedência ou que vivem em áreas que são endêmicas a cisticercose</li> <li>• - História de viagens frequentes a áreas endêmicas a doença.</li> </ul> </li> </ul>	
Diagnóstico	Critério
Definitivo	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presença de 1 critério absoluto</li> <li>2. Presença de 2 critérios maiores, 1 menor e 1 epidemiológico</li> </ol>
Provável	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presença de 1 critério maior e 2 menores</li> <li>2. Presença de 1 critério maior, 1 menor e 1 epidemiológico</li> <li>3. Presença de 3 critérios menores e 1 epidemiológico</li> </ol>

O estudo pareado do LCR e do soro que inclui citologia, dosagens bioquímicas, determinação do quociente de albumina e índice de IgG contribuem para um diagnóstico preciso. A detecção de anticorpos anti-cisticercos no LCR ainda é considerada uma pesquisa mais específica para o diagnóstico da NC. Haja vista, a detecção de anticorpos específicos da classe IgG, no soro de pacientes com suspeita de cisticercose também é importante para a determinação da presença de cistos localizados tanto fora quanto dentro do SNC. A observação da integridade da barreira hemato-LCR e da síntese intratecal de anticorpos específicos é feita por estudo comparativo de valores encontrados no soro e no LCR (REIBER e FELGENHAUER, 1987).

### **2.2.3 EXAME DE IMAGEM APLICADO A NEUROCISTICERCOSE**

A Tomografia Computadorizada (TC) de crânio e a Ressonância Magnética (RM) de crânio são os dois exames de imagem indicados para a avaliação de pacientes com suspeita de NC. Ambos são instrumentos importantes para o diagnóstico da NC, pois permitem, de forma não invasiva, detectar e acompanhar a localização, o estágio de desenvolvimento e a evolução do parasita bem como avaliar o processo inflamatório decorrente da degeneração do mesmo no SNC (AGAPEJEV, 1994).

### **2.2.4 EXAME DO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO NA NEUROCISTICERCOSE**

O exame do LCR constitui um elemento essencial para o diagnóstico e acompanhamento da evolução de pacientes com NC (LIVRAMENTO, 1987). No entanto, este exame pode apresentar um perfil dentro dos limites da normalidade em cerca de 20 a 25% dos casos (AGAPEJEV, 1994).

A síndrome clássica do LCR na NC descrita por Lange (1940) (*apud* MACHADO *et al*, 2002) inclui a presença de pleocitose discreta a moderada com predomínio de linfócitos, eosinoflorraquia, hiperproteínorraquia e reatividade de testes imunológicos para NC.

### **EXAME DE ROTINA DO LCR**

A citologia global embora possa ser normal, pleocitose discreta (4 a 50 leucócitos por mm<sup>3</sup>) a pleocitose moderada (55 a 190 leucócitos por mm<sup>3</sup>) tem sido descritas (REIS *et al*, 1980).

A citologia diferencial nos casos de NC apresenta padrão linfomonocitário. Entretanto, a participação de eosinófilos com percentagem igual ou superior a 2% é característica da enfermidade. Pode ocorrer também a presença de neutrófilos em quadros inflamatórios agudos (REIS *et al*, 1980; MACHADO *et al*, 1996).

A concentração de proteínas totais pode ser normal ou discretamente elevada (10 a 45 mg/dl) ou pode ocorrer moderada hiperproteínorraquia (até 120 mg/dl). A glicorraquia, em geral, apresenta valores dentro dos limites da normalidade (2/3 da glicemia); (REIS *et al*, 1980; FISHMANN, 1992).

### **EXAME IMUNOLÓGICO**

Com o aprimoramento tecnológico, novos elementos foram incluídos à síndrome clássica da NC como o estudo pareado do LCR/soro que tem como objetivo avaliar a função da barreira hemato-LCR (através do quociente de albumina) e a síntese intratecal de IgG. O quociente de albumina (vide fórmula) é realizado com a dosagem da albumina do

LCR e da albumina do soro e, os valores de normalidade variam de acordo com a idade do paciente (quadro 3).

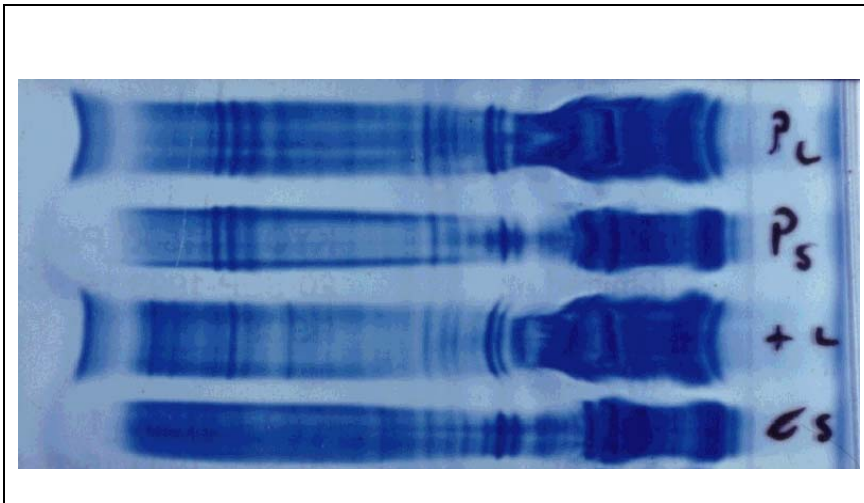
- $$Q. \text{ Albumina} = \frac{\text{Albumina (LCR)}}{\text{Albumina (soro)}} \times 10^{-3}$$

**Quadro 3.** Valores referenciais para o Quociente de Albumina

Idade	Q. albumina (LCR/soro)
Recém-nascido	$25 \times 10^{-3}$
1 mês	$15 \times 10^{-3}$
6 meses	$5 \times 10^{-3}$
20 anos	$5 \times 10^{-3}$
40 anos	$7 \times 10^{-3}$
60 anos	$8 \times 10^{-3}$

A síntese intratecal de IgG indica a presença de reação inflamatória no LCR. Esta avaliação pode ser realizada através de métodos quantitativos e métodos qualitativos. Dentre os métodos quantitativos, o índice de IgG e a curva hiperbólica (Diagrama de Reiber e Felgenhauer, 1987) são utilizados com frequência. O índice de IgG (vide fórmula) é calculado através dos quocientes de IgG e de albumina entre o LCR e o soro (valor de referência < 0,7) . Os métodos qualitativos incluem a pesquisa de bandas oligoclonais IgG (figura 7).

- Índice de IgG =  $\frac{Q. \text{ IgG } (LCR/soro)}{Q. \text{ Albumina } (LCR/soro)}$



**Figura 7.** Pesquisa de bandas oligoclonais IgG pelo método de focalização isoelétrica

### 2.2.5 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS APLICADOS A NEUROCISTICERCOSE

O exame do LCR na forma ativa da NC é caracterizado pela síndrome clássica da NC e pela presença de lesões cerebrais como cistos e, pode ser avaliada através de exames de imagem e do LCR, onde são analisados a celularidade, a bioquímica e as reações imunológicas para detecção de anticorpos anti-cisticercos no LCR. Em adição, inúmeras reações imunológicas são utilizadas para a detecção de anticorpos anti-cisticercos no LCR com diferentes valores de sensibilidade e especificidade, tais como o ELISA e o WB (MACHADO *et al*, 2002).

### **ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)**

O método de ELISA baseia-se na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas para a detecção e quantificação de substâncias de interesse biológico. É o teste que tem apresentado melhor acurácia quando aplicado ao LCR com valores de sensibilidade de 87% e de especificidade de 95% (SOTELO e DEL BRUTTO, 2002). No nosso meio o valor de sensibilidade de 100% já foi obtido (COSTA *et al*, 1982). Estudos demonstram que o teste de ELISA no soro apresenta sensibilidade que varia de 63 a 89 % e a especificidade varia de 80 a 100% (PIALARISSI *et al*, 1995; BUENO *et al*, 2000). Por outro lado, deve-se ressaltar a ocorrência de reações falso-positivas, decorrentes da reação cruzada com outros helmintos e com o *Mycobacterium tuberculosis*, bem como de reações falso-negativas quando as lesões são parenquimatosas distantes do sistema do LCR (GEKELER *et al*, 2002; KATTI, 2002). Em adição, para a pesquisa de anticorpos, a utilização de extratos brutos antigênicos de *Cysticercus cellulosae* (antígenos não purificados) e de amostras não diluídas, podem aumentar o limiar de reações inespecíficas e contribuir para ocorrência de reações falso-positivas (SANCHEZ, 2001).

### **REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO, HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA**

A reação de fixação de complemento primeiramente incluída por Lange (1936) (*apud* MACHADO, 1996) na rotina laboratorial do LCR consiste na utilização de quantidades definidas de complemento para a detecção de antígenos e/ou anticorpos. Apresenta sensibilidade de 83% para o LCR inflamatório e apenas 22% para pacientes com lesões parenquimatosas (SOTELO E DEL BRUTTO, 2002). Outras técnicas como a

hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI) são utilizadas para o diagnóstico da NC. A HAI consiste na adsorção de antígenos à superfície das hemácias as quais podem ser aglutinadas por anticorpos específicos. A IFI baseia-se na capacidade do anticorpo se ligar a substâncias excitadas com alta energia (fluorocromos) e o resultado é a emissão de luz de elevado comprimento de onda (fenômeno denominado de fluorescência). Os respectivos valores de sensibilidade e de especificidade de 89% e 97% foram obtidos para HAI e de 87% e 99% para IFI (SANCHEZ, 2001; VAZ e LIVRAMENTO, 2001).

### **WESTERN BLOT**

Este método é utilizado para a identificação de glicoproteínas específicas que são separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida. Os valores de sensibilidade e especificidade do teste de ELISA no soro são menores do que os do WB. De acordo com estudos recentes o WB no soro apresenta sensibilidade de 98% e especificidade de 100% para amostras de soro e, portanto é considerado o melhor teste para detecção de anticorpos anti-cisticercos no soro (TSANG *et al*, 1989; SANCHEZ, 2001).

### **3. OBJETIVOS**

- Avaliar se os parâmetros do LCR podem influenciar na reatividade da resposta imune específica no LCR para NC, através do teste de ELISA;
- Determinar um ponto de corte “ótimo” (cut-off) para os parâmetros estudados;
- Avaliar o perfil inflamatório do LCR na NC;
- Avaliar a função da barreira hemato-LCR na NC.

## 4. METODOLOGIA

### População

Durante o período de janeiro de 1999 a maio de 2002, 109 amostras de LCR foram analisadas. As amostras de LCR selecionadas foram de pacientes admitidos para investigação em um Laboratório de referência em Líquido Cefalorraqueano da cidade do Rio de Janeiro (Neurolife Laboratórios) e no Laboratório de Líquido Cefalorraqueano do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ). Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética do Hospital Universitário Gafrrêe e Guinle (HUGG/UNIRIO) e do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ). Após o estabelecimento da hipótese diagnóstica, as amostras de LCR foram classificadas em grupos. O grupo de amostras de pacientes com neurocisticercose foi selecionado de acordo com o critério de Sotelo *et al* (1985). O grupo de amostras pacientes com falso-reatividade e que apresentavam esclerose múltipla foi selecionado de acordo com critério de MC Donald *et al* (2001). As amostras de pacientes com meningites viral e bacteriana, tumor cerebral, polirradiculopatia inflamatória crônica desmielinizante e acidente vascular encefálico foram selecionadas de acordo com Adams *et al* (2001):

- Grupo A - 18 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico de NC baseado na presença de manifestações cínicas compatíveis com NC e reatividade do teste de ELISA para NC no LCR;



- Grupo B – 50 amostras de LCR de pacientes com doenças neurológicas não-compatíveis com NC e reatividade do teste de ELISA para NC no LCR: Síndrome de Guillain Barrè (quatro pacientes), polirradiculopatia inflamatória crônica desmielinizante (dez pacientes), meningite bacteriana (22 pacientes), acidente vascular encefálico (quatro pacientes), tumor cerebral (cinco pacientes);
- Grupo C – 41 amostras de LCR de pacientes com doenças neurológicas não-compatíveis com NC e ausência de reatividade do teste de ELISA para NC no LCR: esclerose múltipla (quatro pacientes), polirradiculopatia inflamatória crônica desmielinizante (29 pacientes) e tumor cerebral (oito pacientes).

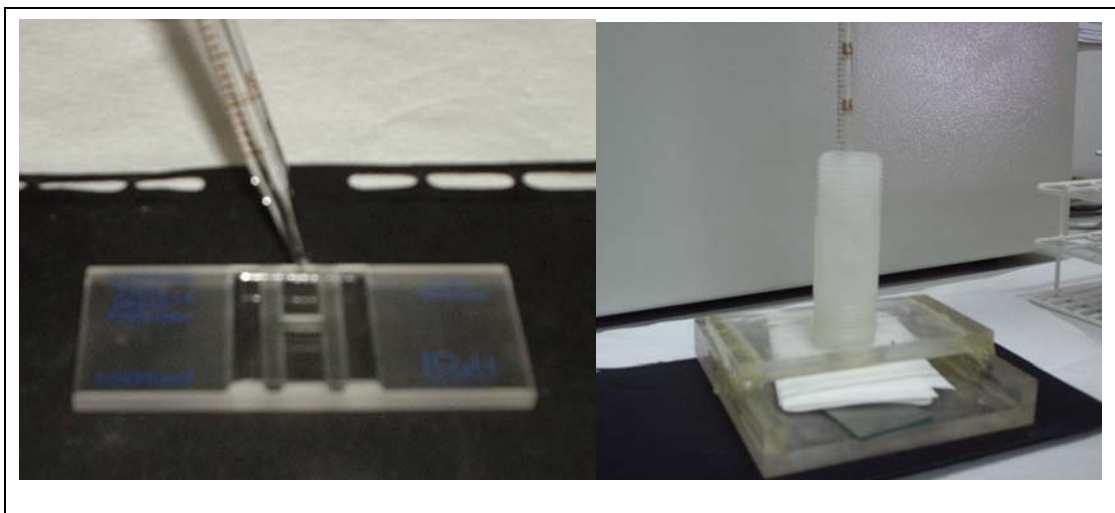
## **ANÁLISE DO LCR**

As amostras de LCR selecionadas foram analisadas quanto à celularidade global e celularidade específica, bioquímica (proteínas totais e glicose) e presença de anticorpos para HIV, para HTLV-I, *Citomegalovirus*, *Simplexvirus* e *Toxoplasma gondii* utilizando kits comerciais de ELISA.

### **Citologia**

A contagem celular global foi realizada utilizando-se a câmara de Fuchs-Rosenthal e a visualização em microscópio óptico (figura 8). Quanto à celularidade específica, foi adicionado um mililitro de LCR na câmara de sedimentação (câmara de “suta”) para

concentração celular (figura 9). A lâmina com o conteúdo celular foi corada pelo conjunto de corante panótico rápido (Laborclin Ltda) e visualizada em microscópio óptico.



**Figuras 8 e 9.** Câmara de Fuchs-Rosenthal e câmara de sedimentação celular.

### **Bioquímica**

A dosagem de proteínas totais foi realizada utilizando-se ácido tricloroacético (ISO FAR, Ácido Tricloroacético, P. A) a 10% (500  $\mu$ l de LCR + um mililitro do reagente). A glicose foi dosada utilizando-se o kit comercial para glicemia enzimática (Wiener Lab.) e seguindo as instruções do fabricante.

### **Estudo microbiológico**

A presença de bactérias e fungos foi analisada pelos métodos convencionais para o isolamento e identificação. Para as bactérias o LCR foi semeado nos meios de cultura comerciais (Plastilabor Ltda), em placas, de ágar sangue de carneiro a 5% e ágar chocolate. O ágar Sabouraud, em tubo, a 2% com cloranfenicol foi utilizado para a cultura de fungos.

### **Análise da barreira hemato-LCR e síntese intratecal de IgG**

As amostras de LCR e soro foram analisadas para IgG total e albumina pela nefelometria (Dade Behring, Inc. Marburg GmbH, Alemanha). A síntese intratecal de imunoglobulinas foi baseada no IgG<sub>IF</sub> (fração intratecal) de acordo com Reiber & Felgenhauer (REIBER e FELGENHAUER, 1987). A função da barreira hemato-LCR foi determinada pelo quociente de albumina (relação entre a albumina do LCR e do soro).

### **Estudo imunológico específico do LCR**

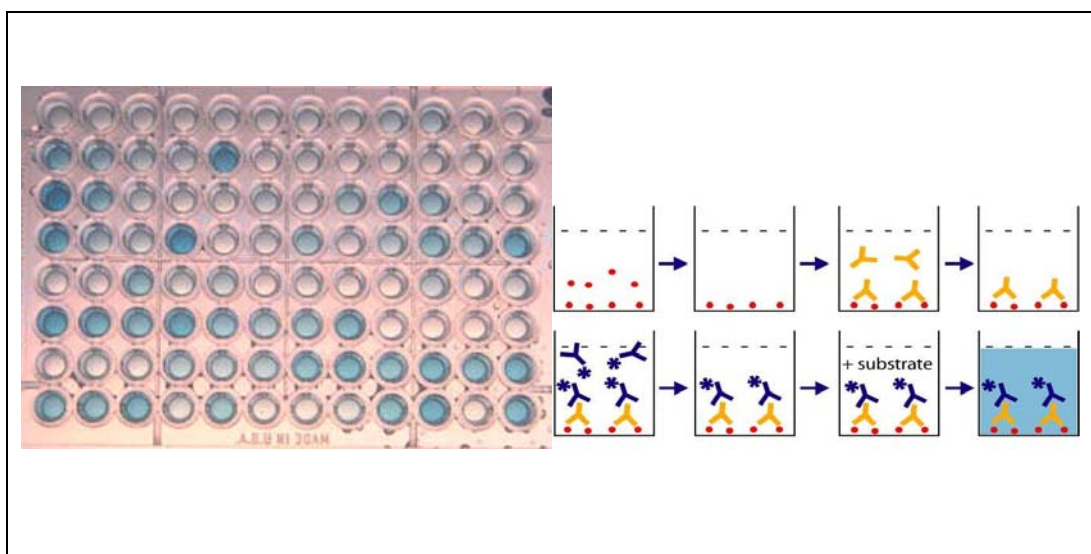
Para a pesquisa de anticorpos para HIV e HTLV-I utilizou-se os kits comerciais da BIO-RAD Brasil Laboratórios Ltda, respectivamente e seguindo as instruções do fabricante. A pesquisa de anticorpos para *Citomegalovirus*, *Simplexvirus* e *Toxoplasma gondii* foi testada, respectivamente, pelos kits comerciais da Richmond Diagnostics e seguindo as instruções do fabricante.

### **Análise específica para Neurocisticercose no LCR**

Os anticorpos para antígenos de *Taenia solium* foram detectados utilizando-se o teste comercial BioELISA Neurocist (BioMérieux Brasil S. A.) RJ, Brasil seguindo as instruções do fabricante. O índice relativo do ELISA para NC foi determinado dividindo-se a densidade óptica (OD) da amostra pela leitura da OD do cut-off do teste.

No teste comercial de ELISA realizado para NC foi utilizado extrato antigênico de *Cysticercus cellulosae* aderido à superfície interna das microcavidades contidas na placa de poliestireno. As amostras de LCR e dos controles foram aplicados nestas microcavidades, onde anticorpos anti-cisticercos, quando presentes, ligaram-se

especificamente ao antígeno. Após um período de incubação, as amostras e os controles foram lavados e o conjugado ligado a peroxidase foi adicionado. Estes anticorpos ligaram-se às microcavidades que continham anticorpos anti-cisticercos remanescentes da etapa anterior. A presença destes conjugados foi determinada pela ação da peroxidase no substrato tetrametilbenzidina (figuras 10 e 11). A reação final foi obtida, por espectrofotometria, pela leitura impressa da densidade óptica em filtros 450/630 nm. Os resultados foram estabelecidos de acordo com o limiar de reatividade ou cut-off.



**Figuras 10 e 11.** Exemplo de placa de ELISA e um esquema do método de ELISA

### **Análise Estatística**

O teste de Mann-Whitney foi o método estatístico usado para comparar os dados quantitativos e o teste de Fisher ou Chi-quadrado para as proporções. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

A curva ROC (receiver operator characteristic) compara a relação entre a sensibilidade e a especificidade pelo método gráfico para a análise de dados. Um ponto de corte ótimo para os parâmetros do LCR foi encontrado através da análise da curva ROC com o objetivo de diferenciar os grupos A e B.

## 5. RESULTADO

A média e o desvio padrão da idade dos pacientes nos grupos A, B e C foram  $40,83 \pm 18,26$ ,  $44,72 \pm 21,84$  e  $32,68 \pm 16,26$  anos, respectivamente ( $p > 0,05$ ). As manifestações clínicas mais frequentes dos pacientes do grupo A (NC) estão na tabela 1.

**Tabela 1.** Manifestações clínicas e classificação de 18 pacientes com diagnóstico de neurocisticercose (Grupo A)

Manifestações Clínicas		Formas Ativas		Formas Inativas
Cefaléia	Convulsões	Cistos	Hidrocefalia	Calcificações
(8) 28%	(10) 72%	(6) 33%	(2) 11%	(10) 56%

Diferenças significativas nos parâmetros do LCR foram encontradas na análise laboratorial dos três grupos estudados (Tabela 2). No grupo A, a maioria das amostras de LCR apresentou achados compatíveis com cisticercose, tais como pleocitose moderada com predomínio de linfócitos e monócitos associados a eosinófilos (11%) e a hiperproteínoorraquia. Um número significativo de pacientes (60%) teve síntese intratecal de

IgG total. Todos tiveram anticorpos anti-cisticercos no LCR. A presença de pleocitose, eosinófilos e anticorpos anti-cisticercose representam a clássica síndrome do LCR da NC. O grupo B representa um elevado número de pacientes com intensa pleocitose, presença de hemácias, maior concentração de proteínas totais e disfunção da barreira hemato-LCR bem como a presença de anticorpos para diferentes agentes de doenças infecciosas em comparação com as amostras dos grupos A e C. As amostras do grupo C foram normais, exceto por uma discreta pleocitose e pela presença de hemácias em dois pacientes. Todas as amostras de LCR deste grupo tiveram resultados negativos quando testados para anticorpos para NC (Tabela 2).

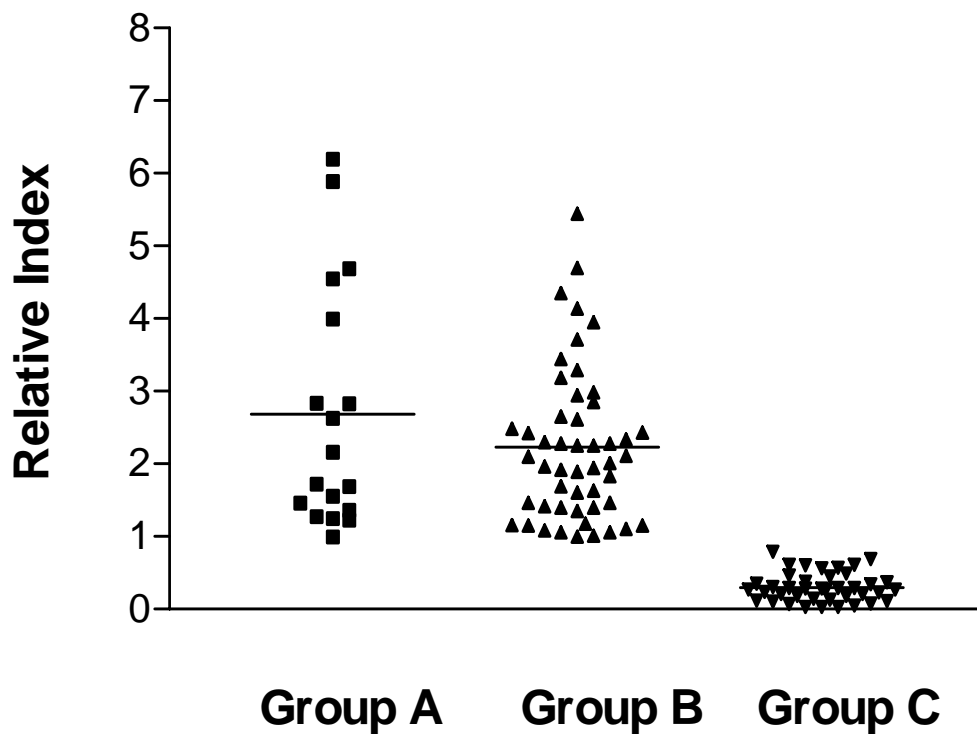
**Tabela 2.** Resultados da análise laboratorial de amostras de LCR de pacientes com manifestações neurológicas e resultados positivos (Grupos A e B) ou negativos (Grupo C) do teste de ELISA para neurocisticercose.

Laboratório	Grupos de Amostras de LCR			Análise Estatística		
	A n=18	B n=50	C n=41	AxB Valor <i>p</i>	AxC Valor <i>p</i>	BxC Valor <i>p</i>
Achados						
Pleocitose > 4/mm <sup>3</sup>	33%	66 %	5 %	<0.05	<0.05	-----
Hemácias > 0/mm <sup>3</sup>	44%	68 %	58 %	<0.05	>0.05	>0.05
Proteína ≥ 40 mg/dl	55%	88 %	0 %	<0.05	<0.05	<0.05
(IgG <sub>IF</sub> ) > 10%	60%	27%	0 %	>0,05	<0.05	<0.05
Q. Albumina > 7 x 10 <sup>-3</sup>	33%	73 %	0 %	<0.05	-----	-----
ELISA reagente para	100 %	100 %	0 %	----	-----	-----
Cisticercose no LCR						
ELISA reagente para outros	6%	46 %	0 %	<0.05	-----	-----
agentes infecciosos testados*						

IgG<sub>IF</sub> (fração intratecal de IgG) > 10% indica síntese intratecal de IgG; Q. Albumina > 7 x 10<sup>-3</sup> indica disfunção da barreira hemato-LCR.\* HIV, HTLV-I, *Citomegalovírus*, *Simplexvírus*, *Toxoplasma gondii*.

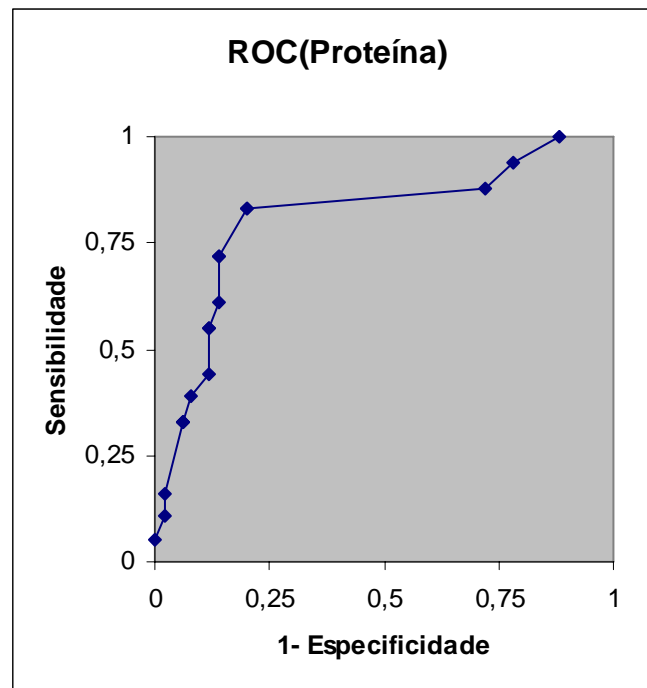
As amostras dos grupos A e B não apresentaram diferença na distribuição do índice relativo de ELISA (Figura 12).

**Figura 12.** Índice relativo de ELISA para neurocisticercose nos grupos A, B e C



A curva ROC (figura 13) mostra o melhor ponto de corte para a concentração de proteínas totais do grupo A (pacientes com diagnóstico de NC);  $\leq 60$  mg/dl, com sensibilidade 83% e 80% de especificidade. O melhor ponto de corte para pleocitose foi  $\leq 7$  p/mm<sup>3</sup>, com sensibilidade de 77,8% e especificidade de 64%.





**Figura 13.** Curva ROC da concentração de proteínas de 18 pacientes com neurocisticercose (Grupo A)

## DISCUSSÃO

A NC é uma afecção crônica do SNC caracterizada pela apresentação pleomórfica e não específica das manifestações clínicas, o que dificulta o diagnóstico. Devido à gravidade dos sintomas de apresentação, é a forma que desperta maior interesse médico e de pesquisa. Estudos epidemiológicos apontam a importância da análise do complexo teníase-cisticercose como um problema de saúde pública que afeta a população de países, em geral, com precárias condições sanitárias como os da América Latina e a Índia. Deve-se ressaltar, ainda, a elevada frequência de casos de NC nos países industrializados e nos da Europa que recebem imigrantes de áreas endêmicas à NC, como o México. No Brasil, os Estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná e São Paulo têm sido citados como áreas endêmicas à NC. Contudo, estudos que apresentem com exatidão a frequência dessa infestação em nosso território necessitam serem realizados. No entanto, a profilaxia e a educação são as melhores medidas para o controle dessa e de outras parasitoses (LIVRAMENTO, 1987; VAZ e LIVRAMENTO, 2001).

O diagnóstico definitivo, em geral, está vinculado ao padrão ouro como na presença do parasita em exames fundoscópicos ou histopatológicos ou em necrópsias (DEL BRUTTO *et al*, 2001; DORNY *et al*, 2003). Nesta última situação, inviável à vida. No entanto, atualmente, há o consenso da análise em conjunto dos estudos clínicos, epidemiológicos, de imagem e pareados do LCR e do soro (DEL BRUTTO *et al*, 2001; VAZ e LIVRAMENTO, 2001). O LCR, fluido biológico de aspecto de “água de rocha”, constitui parte acessível ao estudo da homeostase do SNC (FISHMANN, 1992; LIVRAMENTO, 1987). Com

relação a nosologia da NC, a análise do LCR apresenta-se como elemento básico para o diagnóstico e evolução da doença (LIVRAMENTO, 1987). Os exames de imagem (TC e RM) são, também, elementos importantes para o diagnóstico e acompanhamento evolutivo da NC, principalmente, quanto à presença lesões como cistos e nódulos calcificados. Esses exames são capazes, de forma não invasiva, apresentar a localização, o estágio de desenvolvimento e a presença de processo inflamatório causado pelo parasita (AGAPEGEV, 1994; LIVRAMENTO, 1987).

Os achados da rotina laboratorial do exame de LCR foram os fatores determinantes para a investigação proposta pelo presente estudo. O teste de ELISA para NC apresentou resultados positivos, os quais não eram compatíveis com a suspeita e com as manifestações clínicas dos pacientes analisados. Surgiu a hipótese de que o exame do LCR poderia estar influenciando na apresentação de resultados falso-positivos, para os casos estudados, relacionados com a disfunção da barreira hemato-LCR decorrentes de outros processos.

Há estudos que apresentam casos de falso-positividade do teste de ELISA devido a reações cruzadas com outros helmintos, com *Shistosoma mansoni* e com o *Mycobacterium tuberculosis* (GEKELER *et al*, 2002; KATTI, 2002; PAMMENTER *et al*, 1992).

Num estudo realizado com pacientes com NC e pacientes neurológicos, os autores observaram a presença de reações cruzadas entre amostras de pacientes com NC e com neuroesquistossomose testadas pelos métodos de ELISA (PAMMENTER *et al*, 1992). De 224 amostras de LCR, oito (2%) amostras foram positivas para ambos antígenos, 24 (10%) foram positivas para antígenos de *S. mansoni* e, também, apenas oito (4%) foram positivas para anticorpos anti-cisticercos. A falso-reatividade ocorreu, possivelmente, quando as amostras testadas foram positivas para ambos antígenos devido à quebra de barreira

hemato-LCR com a passagem de anticorpos séricos de *S. mansoni* para o LCR. É interessante destacar que, muito certamente, esses pacientes não apresentavam neuroesquistossomose.

A falso-reatividade entre antígenos de *Taenia solium* e antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* devido, também, a danos à barreira hemato-LCR foi observada pelo estudo de 272 amostras de LCR (KATTI, 2002). Esse estudo foi similar ao nosso quanto à distribuição das amostras em dois grupos: I, com diagnóstico definido de NC e neuroesquistossomose, e II, grupo controle. As amostras foram testadas pela hemaglutinação e pelo WB. A análise revelou a presença de anticorpos anti-cisticercos em cinco amostras confirmadas de *Mycobacterium tuberculosis*. Esse fato ratifica a hipótese da quebra de barreira hemato-LCR com passagem de anticorpos anti-cisticercos do soro para o LCR.

A afecção por outros helmintos além da NC é um outro aspecto abordado e correlaciona-se com os dados apresentados nos estudos acima relatados. Reações cruzadas e falso-positividade do teste de ELISA para NC no LCR bem como do WB (realizado no LCR) são observados (GEKELER *et al*, 2002). A falso-reatividade dos testes de ELISA e WB pela infestação por parasitos do gênero *Echinococcus* (54% pela forma cística e 69% pela forma alveolar) é a que apresenta maior porcentagem no soro, nesse estudo realizado em 222 amostras de LCR (n=54) e soro (n=168) (GEKELER *et al*, 2002). Das 24 amostras confirmadas de NC no soro 18 (75%) foram positivas, ambas, pelo ELISA e WB. Das amostras de LCR com diagnóstico definitivo de NC, 83% foram positivas pelo método de ELISA e 86% pelo WB. Amostras do grupo controle (negativo) foram negativas para ambos testes. Nesse estudo, ainda, é interessante relatar que os valores de sensibilidade e

especificidade, respectivamente, foram praticamente idênticos, no LCR, tanto no ELISA (80% e 75%) quanto no WB (82% e 94%). O mesmo estudo menciona a ocorrência de resultados falso-positivos no WB e não no LCR, em pacientes mexicanos com outras doenças neurológicas que não a NC devido a possível afecção prévia por *Taenia solium*. A esse fato soma-se a ocorrência de quebra de barreira hemato-LCR e passagem de anticorpos anti-cisticercos do soro para o LCR.

No presente estudo, foi estabelecida uma relação entre a falso-reatividade dos testes para a detecção de anticorpos para NC no LCR e a disfunção da barreira hemato-LCR obtida pelo quociente de albumina. Baseado nestes achados, acredita-se que o processo inflamatório meníngeo possa influenciar os resultados dos testes de ELISA para NC no LCR, facilitando a passagem de proteínas do soro para o LCR que induzem reações falso-positivas.

Considerando que os pacientes do grupo A são os verdadeiros positivos (pacientes com NC) e o grupo C os verdadeiros negativos, o problema com os resultados “falso-positivos” surge dos pacientes do grupo B (pacientes com doenças neurológicas não-compatíveis com NC e reatividade do teste de ELISA para NC no LCR).

Diferenças significativas foram encontradas entre os parâmetros do LCR no grupo da NC (grupo A) e nos grupos-controle (grupos B e C). A comparação estatística entre as amostras dos grupos A e B demonstraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os seguintes parâmetros: concentração de proteínas, pleocitose, quociente de albumina, frequência da reatividade do ELISA para outros agentes infecciosos e presença de hemácias. A elevada concentração de proteína associada à disfunção da barreira hemato-LCR dentre as amostras de LCR no grupo B indicam que esta proteína não foi sintetizada

no SNC (REIBER e PETER, 2001). É importante comentar que neste grupo, 46% dos pacientes tiveram resultados de ELISA reagentes, também, para outros agentes infecciosos, com uma percentagem relativamente maior em comparação aos outros dois grupos (0% no grupo C e 6% no grupo A). Neste mesmo grupo, uma elevada pleocitose associada a outros agentes de doenças infecciosas (meningites viral e bacteriana) indicam processo inflamatório meníngeo não relacionado à NC. Além disso, neste grupo todas as amostras de LCR tiveram ELISA reagentes para NC, mas não haviam achados clínicos e de imagem para NC. Os resultados falso-positivos para o teste de ELISA no soro têm sido detectados provavelmente devido a proteínas que se ligam aos antígenos de cisticercos de *Taenia solium* (LARRALDE *et al*, 1990; PROAÑO-NARVEZ *et al*, 2002). Glicoproteínas de *Taenia solium* têm sido consideradas muito sensíveis e específicas para o diagnóstico da NC quando o ensaio de WB é usado com amostras de soro, mas elas não mostram a mesma eficácia no teste de ELISA no soro (PROAÑO-NARVEZ *et al*, 2002). A ocorrência de reações falso-positivas no teste de ELISA no LCR pode estar relacionada à disfunção da barreira hemato-LCR que permite a passagem de anticorpos do soro e de outras proteínas para o SNC. Como já mencionado, soma-se a esse fato a ocorrência de reatividade cruzada com outros agentes infecciosos (GEKELER *et al*, 2002; KATTI, 2002; PAMMENTER *et al*, 1992). É importante ressaltar que neste estudo não foi aceita a hipótese de reatividade cruzada com outros agentes infecciosos devido à presença não apenas de outras doenças infecciosas (meningites viral e bacteriana), mas, também, não infecciosas (cefaléia, tumor e polineuropatia).

A curva ROC foi utilizada para comparar a sensibilidade e especificidade dos parâmetros do LCR para os grupos A (NC) e B (falso-positivos para NC), com o objetivo

de obtenção do melhor ponto de corte, para diferenciar os grupos. Baseado em nossos achados, foi demonstrada uma grande probabilidade de reações falso-positivas no LCR pelo ELISA para NC nos casos de elevada pleocitose ( $\geq 7$  células/mm<sup>3</sup>) ou elevada concentração de proteína ( $\geq 60$  mg/dl).

Alguns estudos têm sido conduzidos com objetivo de melhorar o diagnóstico da NC (DEL BRUTTO *et al*, 2001; DORNY *et al*, 2003). A análise da integridade da função da barreira hemato-LCR tem contribuído para determinar a síntese intratecal de anticorpos. Além disso, antígenos purificados de larva de *Taenia* obtidos a partir de parasitas homólogos (*T. solium*) ou heterólogos (*T. crassiceps*) têm sido caracterizados com o objetivo de obter reagentes com alto grau de especificidade (BUENO *et al*, 2000; DORNY *et al*, 2003; PARDINI *et al*, 2002; PERALTA *et al*, 2002). Preparações antigênicas contaminadas com proteínas de suínos, um problema comum quando cistos de *Taenia solium* são utilizados, são evitados usando-se antígenos obtidos a partir de larvas de *Taenia crassiceps* (PARDINI *et al*, 2002; PERALTA *et al*, 2002).

Sendo um estudo retrospectivo, ocorreram limitações, tais como a ausência da análise pareada de amostras de soro para a comparação de anticorpos específicos do soro e do LCR. O critério de Sotelo foi utilizado para o diagnóstico da NC, considerando-o mais apropriado para o tipo de estudo. Esse critério é baseado predominantemente em dados clínicos e em exames de imagem (SOTELO *et al*, 1985).

## CONCLUSÃO

- A disfunção da barreira hemato-LCR contribui para a elevada frequência de reações falso-positivas para NC, através da passagem de proteínas do sangue para o LCR.
- Os achados inflamatórios do LCR podem influenciar a imunoreatividade do teste de ELISA no LCR para a NC. Pacientes com reatividade do teste de ELISA para NC no LCR sem NC (falsos-positivos) tiveram uma frequência aumentada da disfunção da barreira hemato-LCR, elevada concentração de proteínas totais, pleocitose e hemácias em comparação aos pacientes com reatividade do teste ELISA para NC no LCR e com NC (verdadeiros positivos).
- A chance de ocorrência de resultados falso-positivos do teste de ELISA para NC aumenta com a concentração de proteínas maior que 60 mg/dl (sensibilidade de 83% e especificidade de 80%) e pleocitose maior que 7 leucócitos/mm<sup>3</sup> (sensibilidade de 77,8% e especificidade de 64%).
- O exame do LCR dos pacientes com NC se caracterizou pela presença de pleocitose discreta a moderada com predomínio de linfócitos, eosinofilia, hiperproteínoorraquia e reatividade de testes imunológicos para NC.
- Os resultados do teste de ELISA devem ser cuidadosamente considerados em conjunto com outros parâmetros: clínicos, laboratoriais e dados epidemiológicos para o diagnóstico da NC.
- Testes confirmatórios para o LCR devem ser incluídos na rotina laboratorial para o diagnóstico da NC.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.D.; VICTOR, M.; ROPPER, A.H. **Principles of Neurology**. International Edition 2001; MC Graw-Hill.
- AGAPEJEV, S. **Neurocisticercose: quando e como investigar**. In: Neuroinfecção 94. São Paulo. Clínica Neurológica HC/FMUSP, 1994. Cap. 8, p. 37-40.
- BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. R. *et al.* **Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides of neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples**. J Clin Microbiol 2000;38:146-151.
- BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. R. *et al.* **Detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens**. Arq Neuropsiquiatr 2000;58(1):18-24.
- CASANOVA, C. S.; RIBEIRO, M. J. S. P.; GONÇALVES, R. R. *et al.* **Influence of the cerebrospinal fluid laboratory parameters in the ELISA test for neurocysticercosis using a total cysticerci antigen**. Arq Neuropsiquiatr 2006;64(1):55-59.
- COSTA, J. M.; FERREIRA, A. W.; MAKINO, M. M. **Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis**. Rev Med Trop São Paulo, 1982; 24(6):337-341.
- DEL BRUTTO, O.,H.; RAJSHERKHAR, V.; WHITE, A. C. Jr *et al.* **Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis**. Neurology 2001;57:177-183.
- DORNY, P.; BRANDT, J.; ZOLI, A. *et al.* **Serodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis**. Acta Trop 2003;87:79-86.
- FISHMANN, R. A. **Cerebrospinal fluids in diseases of the nervous system**. Philadelphia, 2 nd ed. Copyright 1992, 1980 by Saunders Company.

- GEKELER, F.; EINCHENLAUB, S.; MENDONZA, E. G. *et al.* **Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:227-229.
- ITO, A.; PLANCARTE, A.; MA, L. *et al.* **Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis.** Am J Trop Med Hyg 1998; 59:291-294.
- HAWK, M. W.; SHALAI, K.; KIM, K. D. *et al.* **Neurocysticercosis: a review.** Surg Neurol 2005;63: 123-132.
- KATTI, M. K. **Assesment of antibody responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid of chronic meningitis patients for definitive diagnosis as TBM/NCC by passive hemmagglutination and immunoblot assays.** FEMS Immunol Med Microbiol 2002;33:57-61.
- LIVRAMENTO, J. A. **Síndrome do líquido cefalorraqueano na neurocisticercose.** Arq Neuropsiquiatr 1987;45(3):261-275.
- LARRALDE, C.; SOTELO, J.; MONTOYA, R. M. *et al.* **Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*.** Arch Pathol Lab Med 1990;114:926-928.
- Macedo, H. W.; Peralta, R. H. S.; Cipriano, A. **Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 2002;38(2):93-103.
- MACHADO, L. R. In Neuroinfecção 96. **Neurocisticercose: exame de líquido cefalorraqueano.** Clínica Neurológica HC/FMUSP 1996:205-211.

MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; VAZ, A. J. *et al.* **IgG intrathecal synthesis and specific antibodies index in patients with neurocysticercosis.** Arq Neuropsiquiatr 2002;60 (2-B):395-9.

MC DONALD, W. I.; COMPSTON, A.; EDAN, G. *et al.* **Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of Multiple Sclerosis.** Ann Neurol 2001;50:121–127.

PAMMENTER, M. D.; EPSTEIN, S. R.; REES, R. T. **Cross reactions in the immunodiagnosis of schistosomiasis and cysticercosis by a cerebrospinal fluid enzyme-linked immunosorbent assay.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1992;86:51-52

PARDINI, A. X.; PERALTA, R. H.; VAZ, A. J. *et al.* **Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis.** Clin Diag Immunol 2002;9:190-193.

PERALTA, R. H.; VAZ, A. J.; PARDINI, A. *et al.* **Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis.** Act Trop 2002;83:159-168.

PIALARISSI, C. S. M. ; NITRINI, S. M. O. O. **Comparação entre os testes de eritoimunsorção por captura, imoenzimático e hemaglutinação passiva utilizados no diagnóstico da neurocisticercose.** Rev. Saúde Pública 1995;29(2):115-119.

PROAÑO-NARVEZ, J. V.; MEZA-LUCAS, A.; MATA-RUIZ, O. *et al.* **Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay.** J Clin Microbiol 2002;40:2115-2118.

- REIBER, H.; FELGENHAUER, K. **Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantification of the humoral immune response within the central nervous system.** Clin Chem 1987;163:319-328.
- REIBER, H.; PETER, J. B. **Cerebrospinal fluid analysis: disease-related patterns and evaluation programs.** J Neurol Sci 2001;184:101-122.
- REIS, J. B.; BEI, A.; FILHO, J. B. R. **Líquido cefalorraquiano.** São Paulo. Sarvier, 1980; 196-204.
- REY, L. **Parasitologia.** 3ª edição 1991. Editora Guanabara Koogan.
- SANCHEZ, M. C. A. **Testes sorológicos.** In: Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2001. Cap. 2, p. 9-48.
- SHET, T. N.; PILON, L.; KEYSTONE, J. *et al.* **Persistent MR contrast enhancement of calcified neurocysticercosis lesions.** Am J Neuroradiol 1998;19:79-82.
- SOTELO, J., GUERRERO, V., RUBIO, F. **Neurocysticercosis: a new classification base on active and inactive forms.** Arch Inter Med 1985;145:442-445.
- SOTELO, J., DEL BRUTTO, O. H. **Review of neurocysticercosis.** Neurosurg Focus 2002; 12:1-7.
- TSANG, V. C. W; BRANDT, J. A; BOYER, A. E. **An enzyme-linked immoelectrotransfer blot assay glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis.** J Infec Dis 1989; 159:50-59.
- VAZ, A. J, LIVRAMENTO, J. A. **Neurocisticercose.** In: Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2001. Cap. 31, p. 316-322.

WHITE Jr., A. C. **Neurocysticercosis: Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management.** *Annu Rev Med* 2000;51:187-206.

**ANEXO**

- **Publicação em periódico:** CASANOVA, C. S.; RIBEIRO, M. J. S. P.; GONÇALVES, R. R. *et al.* **Influence of the cerebrospinal fluid laboratory parameters in the ELISA test for neurocysticercosis using a total cysticerci antigen.** Arq Neuropsiquiatr 2006;64(1):55-59.

# INFLUENCE OF THE CEREBROSPINAL FLUID LABORATORY PARAMETERS IN THE ELISA TEST FOR NEUROCYSTICERCOSIS USING A TOTAL CYSTICERCI ANTIGEN

Cristiane S. Casanova<sup>1</sup>, Maria José S.P. Ribeiro<sup>2</sup>, Reizer R. Gonçalves<sup>3</sup>, Luiz Cláudio Faria<sup>4</sup>, José Mauro Peralta<sup>5</sup>, Marzia Puccioni-Sohler<sup>6</sup>

**ABSTRACT** - To evaluate if the cerebrospinal fluid (CSF) parameters may influence the cysticercosis immunoreactivity response in the CSF. CSF samples of 109 patients were analyzed and classified in three groups, according to the neurological manifestations and the reactivity in antibody-enzyme linked immunosorbent assay (Ab-ELISA) testing in CSF for neurocysticercosis (NC): group A, 18 patients with neurological disorders compatible with NC and reactive Ab-ELISA in CSF for NC; group B, 50 patients with neurological disorders non-compatible with NC and reactive Ab-ELISA for NC; group C, 41 patients with neurological disorders non-compatible with NC and non-reactive Ab-ELISA in CSF for NC. The CSF analysis in group A was compatible with NC. The group B in comparison to the groups A and C presents higher frequency and intensity of hypercytosis, presence of red blood cells in CSF, protein concentration and immunological reactive test for other etiological agents ( $p \leq 0.05$ ). Based on the present data, we suggest that the inflammatory process and high protein concentration may determine false positive reactions in the Ab-ELISA test for NC in the CSF.

**KEY WORDS:** cerebrospinal fluid, enzyme linked immunosorbent assay, neurocysticercosis.

## **Influência dos parâmetros laboratoriais do líquido cefalorraquidiano no teste ELISA para neurocisticercose utilizando antígeno total de cisticercos**

**RESUMO** - Avaliar se os parâmetros do líquido cefalorraquidiano (LCR) podem influenciar na reatividade da resposta imune específica do LCR na neurocisticercose (NC). Amostras de LCR de 109 pacientes foram analisadas e classificadas em três grupos, de acordo com as manifestações neurológicas e reatividade do teste de Ab-ELISA para NC no LCR. Grupo A, 18 pacientes com enfermidades neurológicas compatíveis com NC e reatividade do teste Ab-ELISA para NC no LCR; grupo B, 50 pacientes com enfermidades neurológicas não compatíveis com NC e reatividade do teste Ab-ELISA para NC no LCR; grupo C, 41 pacientes com enfermidades neurológicas não compatíveis com NC e na ausência de reatividade do teste de Ab-ELISA para NC no LCR. A análise do LCR do grupo A foi compatível com NC. O grupo B apresentou maior frequência e intensidade da pleocitose, da presença de hemácias no LCR, hiperproteínoorraquia, reatividade imune para outros agentes etiológicos em comparação aos grupos A e C ( $p \leq 0.05$ ). Os dados indicam que o processo inflamatório e os elevados níveis de concentração da proteína no LCR podem influenciar na ocorrência de reações falso positivas de Ab-ELISA para NC. Destacamos a importância da correlação clínico-laboratorial para o diagnóstico de neurocisticercose e o uso de testes laboratoriais confirmatórios.

**PALAVRAS-CHAVE:** líquido cefalorraquidiano, ensaio imunoenzimático, neurocisticercose.

Neurocysticercosis (NC) is a common parasitic disease of the human central nervous system (CNS) caused by *Cysticercus cellulosae* the larval stage of *Taenia solium*. The distribution of the disease is universal

and constitutes an important public health problem in developing countries where sanitary conditions are deficient. The diagnosis of NC remains difficult due to the pleomorphic and non-specific manifesta-

<sup>1</sup>Biologist, Master Science Student, Neurology Service / Gaffrêe Guinle University Hospital / Federal University of Rio de Janeiro State (HUGG/UNIRIO), Neurolife Laboratory, Rio de Janeiro RJ, Brazil; <sup>2</sup>Biologist, Neurolife Laboratory; <sup>3</sup>Biochemistry, Neurolife Laboratory CSF Laboratory / Clinical Pathology Service / Clementino Fraga Filho University Hospital / Federal University of Rio de Janeiro (SPC/HUCFF/UFRJ); <sup>4</sup>Biologist, CSF Laboratory / SPC / HUCFF / UFRJ; <sup>5</sup>Titular-Professor, PhD, Institute of Microbiology/UFRJ; Adjunct-Professor, PhD, CSF Laboratory / SPC / HUCFF / UFRJ; <sup>6</sup>Neurology Service / HUGG / UNIRIO; Neurolife Laboratory, Rio de Janeiro/RJ. Support: FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro).

Received 25 April 2005, received in final form 22 August 2005. Accepted 5 October 2005.

Dra. Marzia Puccioni-Sohler - Rua Dezenove de Fevereiro 185 / 705 - 22280-030 Rio de Janeiro RJ - Brasil. E-mail: mpuccioni@hucff.ufrj.br

tions of the disease. Epilepsy and increased intracranial pressure are the most common neurological manifestations associated with NC<sup>1</sup>. The cerebrospinal fluid (CSF) syndrome of NC was described by Lange (1940) (apud Machado et al.<sup>2</sup>). It included the presence of pleocytosis, eosinophils, and antibodies anti-*Toxoplasma gondii* for NC in CSF. In the last decades new diagnostic parameters such as the combined use of epidemiological, clinical and neuroimaging studies have been added to complement the CSF syndrome of NC. Thus, the diagnostic criteria for NC is based on the clinical and epidemiological data, neuroimaging and laboratory studies<sup>3,4</sup>.

Several immunological tests for detecting antibodies to *T. solium* antigens in serum and CSF have been also proposed for the laboratory diagnosis of NC<sup>5-8</sup>. However, most of them are limited in value because of poor sensitivity and/or specificity and the performance of the test which depends on the number, location and stage of development of the parasite<sup>8</sup>. According to published data, Ab-ELISA assay presents a lower level of sensitivity and specificity in detecting serum antibodies anti-*T. solium* compared to electroimmunotransfer blot (EITB) assay, but the values increase up to 97.6% and 98.9% respectively when performed on CSF<sup>5,7,9</sup>. On the base of its sensitivity (98%) and specificity (100%) values, EITB assay is today considered as the best immunological test available for serum. For this reason, Del Brutto et al.<sup>4</sup> proposed that the presence of serum antibody anti-*T. solium* should be considered as a major criteria but only if detected by EITB assay, while Ab-ELISA reactivity detected in the CSF should be a minor criteria (serum Ab-ELISA positivity is not taken into account). Nevertheless due to the lower cost and time needed to perform the test, Ab-ELISA assay is still largely performed both in serum and CSF to support the diagnosis of NC. On the other hand, the sensitivity and specificity of the test for NC may be lower according to the presence of a single lesion or calcifications<sup>4</sup>. Recently studies have demonstrated false positive reactions for NC in CSF samples. This situation usually occurs in the presence of a chronic inflammatory process such as neurotuberculosis or because of cross reactivity to helminth infections, such as echinococcosis<sup>10,11</sup>.

In this study we investigated if the CSF findings may interfere with the reactivity of Ab-ELISA testing evaluated for NC. The analysis of the albumin quotient and the IgG intrathecal fraction (IgG<sub>IF</sub>) were also included to study the blood-CSF barrier function and the intrathecal synthesis of IgG, respectively<sup>12</sup>.

## METHOD

**Population** – We selected 109 cases among patients under laboratory investigation in a reference CSF Laboratory in Rio de Janeiro city (NeuroLife Laboratory) and in CSF Laboratory of the Clinical Pathology Service of the Clementino Fraga Filho University Hospital of the Federal University of Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), during the period between January 1999 and May 2002. The study received approval of the Hospital Ethical Committee Board. After the diagnostic hypothesis was established, according to Sotelo et al.<sup>3</sup>, the patients were classified in three groups:

Group A – 18 patients with diagnosis of established NC based on the presence of neurological manifestations compatible with NC and reactive Ab-ELISA for NC in CSF<sup>3,13</sup>;

Group B – 50 patients with neurological diseases non-compatible with NC and reactive Ab-ELISA for NC in CSF: Guillain Barré syndrome (four patients), chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ten patients), viral meningitis (five patients), bacterial meningitis (22 patients), stroke (four patients), cerebral tumor (five patients)<sup>3,11,13</sup>;

Group C – 41 patients with neurological diseases non-compatible with NC and non-reactive Ab-ELISA for NC in CSF: multiple sclerosis (four patients), chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (29 patients) and cerebral tumor (eight patients)<sup>13,14</sup>.

**CSF analysis** – CSF specimens were evaluated for white and red blood cell counts, protein and glucose concentration and reactivity for HIV, HTLV-III, cytomegalovirus (CMV), *Herpes simplex virus* (HSV) and *Toxoplasma gondii* using Ab-ELISA commercial kits for antibodies detection. Presence of bacteria and fungi was evaluated by conventional methods for culture isolation and identification. Antibodies to *Taenia solium* antigens were detected using BioELISA neurocisti kit (BioMérieux Brasil S.A., RJ, Brazil) following the manufacturer instructions. Ab-ELISA relative index for NC was determined by dividing the optical density (OD) reading obtained for the sample testing by the cut-off OD value. CSF and corresponding serum samples were analyzed for total IgG and albumin by nephelometry (Dade Behring, Inc., Marburg GmbH, Germany). The evaluation of CSF locally synthesized immunoglobulin was based on the IgG<sub>IF</sub> according to Reiber and Felgenhauer<sup>12</sup>. Blood-CSF barrier dysfunction was determined by using the albumin quotient<sup>12</sup>.

**Data analysis** – The Mann-Whitney statistical method was used to compare the quantitative data and the test of Fisher or chi-square for the proportions; p values <0.05 were considered statistically significant.

The receiver operator characteristic (ROC) curve compares the relationship between the sensibility and specificity of the CSF parameters for the groups A and B (by the Graphical Methods for Data Analysis). The ROC curve analysis was selected to find the best cutpoint for the CSF parameters in sense of to differentiate the groups A and B. The sensitivity (% true-positive) and specificity (% false-positive) for each parameter was calculated and compared with the diagnosis criteria.



**RESULTS**

The median and the standard deviation of the age in the groups A, B and C were 40.83±18.26, 44.72±21.84 and 32.68±16.26 yrs., respectively. The most frequent clinical manifestations of the patients from group A (NC) are shown in Table 1.

Significant differences in the CSF parameters were found in the laboratory analysis among the three studied groups (Table 2). In group A, most of CSF samples presented laboratory findings compatible with NC, such as mild pleocytosis with a predominance of lymphocytes and monocytes associated with eosinophils (11%) and hyperproteinorachia. A significant number of patients (60%) had intrathecal synthesis of total IgG. All had antibodies anti-cysticercus of *T. solium* in CSF by ELISA. The presence of pleocytosis, eosinophils and antibodies anti-cysticercus represents the classical syndrome of NC (Table 2). Group B presented a high number of patients with intense pleocytosis, presence of red blood cells, higher concentration of protein and CSF-blood barrier dysfunction in comparison with samples from groups A and C. CSF samples composing group C were normal, except for a discrete pleocytosis and the presence of erythrocytes in two patients. All CSF samples in this group had negative results when tested for antibodies to NC by ELISA (Table 2).

No difference was found in the distribution of the ELISA relative index between samples from groups A and B (Fig 1).

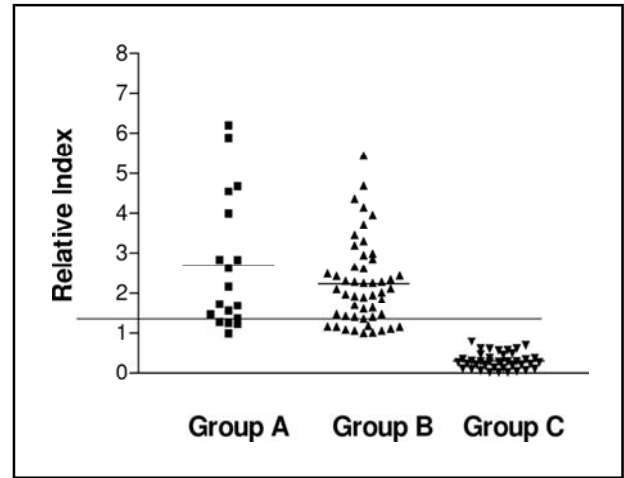


Fig 1. Results of Ab-ELISA testing (using *T. solium* antigens) in CSF samples, expressed as in relative index (sample optical density/cut-off optical density values), obtained from the three groups of patients with neurological manifestations (A – NC patients with positive ELISA test for NC in CSF, B – neurological diseases non-compatible with NC with positive ELISA test for NC in CSF and C – neurological diseases non-compatible with NC with negative ELISA test for NC in CSF).

Table 1. Clinical manifestations, relation of active and inactive forms of NC in group A, (n=18).

Clinical manifestations		Active forms		Inactive forms
Headache	Seizures	Cysts	Hydrocephalus	Calcifications
(8) 28%	(10) 72%	(6) 33%	(2) 11%	(10) 56%

Table 2. Results of laboratory analysis of CSF samples from patients with neurological manifestations and positive (groups A and B) or negative (group C) results in ELISA testing for neurocysticercosis in CSF.

Laboratory Findings	Groups of CSF samples			Statistical analysis		
	A n=18	B n=50	C n=41	AxB p value	AxC p value	BxC p value
Pleocytosis >4/mm <sup>3</sup>	33%	66%	5%	<0.05	<0.05	–
Erythrocytes >0/mm <sup>3</sup>	44%	68%	58%	<0.05	>0.05	>0.05
Protein = >40 mg/dL	55%	88%	0%	<0.05	<0.05	<0.05
(IgGIF) >10%	60%	27%	0%	>0,05	<0.05	<0.05
Q. Albumin >7x10 <sup>-3</sup>	33%	73%	0%	<0.05	–	–
R.E.T. Cysticercosis	100%	100%	0%	–	–	–

R.E.T., (reactive ELISA test) for cysticercosis in CSF; IgG<sub>F</sub> (intrathecal fraction of igG) >10% indicates intrathecal synthesis of IgG; Q. Albumin >7x10<sup>-3</sup> indicates blood-CSF barrier dysfunction.

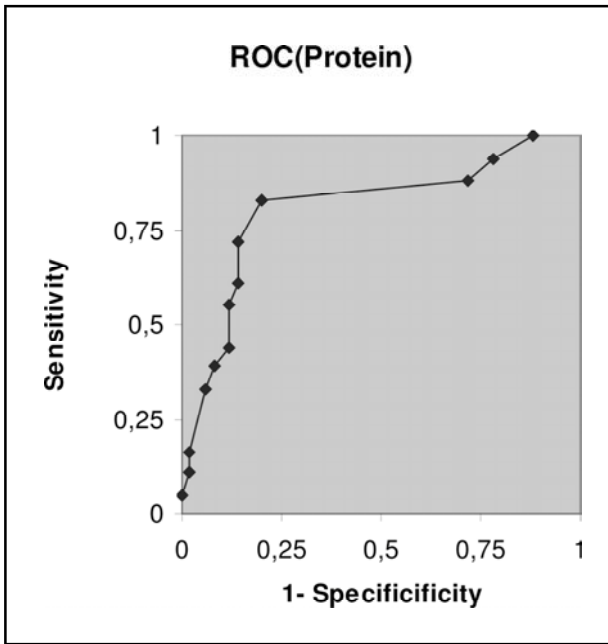


Fig 2. ROC (receiver operator characteristic curve) showing the correlation between sensitivity and specificity for protein concentration in the CSF for the neurocysticercosis diagnosis. The cutpoint represent the degree of diagnostic certainty.

The ROC curve (Fig 2) shows the best cutpoint for the protein concentration in the group A (patients with the diagnosis of NC). The best cutpoint for the protein concentration was  $\leq 60$  mg/dL, with a sensitivity of 83% and a specificity of 80%. The best cutpoint for pleocytosis was  $\leq 7$  cells/mm<sup>3</sup>, with a sensitivity of 77.8% and specificity of 64%. A cutpoint was not found for the other CSF parameters in the group A and B.

## DISCUSSION

Assuming that patients enrolled in group A are the true positive (patients affected by NC) and group C the true negative, the problem with false results arises from the patients enrolled in group B (patients with neurological disorders not compatible with NC and Ab-ELISA reactivity for NC in CSF).

Significant differences were found among the CSF parameters in the NC group (group A) and the control groups (groups B and C). It included: protein concentration, pleocytosis, albumin quotient and the presence of erythrocytes. The high concentration of protein associated with the blood-CSF barrier dysfunction among CSF samples included in group B indicated that part of this protein was not synthesized in the CNS<sup>15</sup>. False-positive results for Ab-ELISA testing in serum have been detected probably due to the serum proteins that bind to cysticercus *T. solium* anti-

gens<sup>5,16</sup>. Glycoproteins of *T. solium* have been considered as very sensitive and specific antigens for NC diagnosis when western blot (WB) assay is used with serum samples but they did not show the same efficiency on Ab-ELISA testing<sup>5</sup>. The occurrence of false-positive reactions in Ab-ELISA CSF test may be related to blood-CSF barrier dysfunction allowing the passage of serum antibodies and other proteins to the CNS.

In the group B, elevated pleocytosis associated with other infectious disease agents (viral and bacterial) indicated meningeal inflammatory process not related with NC. In this group all CSF samples were reactive in the Ab-ELISA for NC but without clinical and imaging findings for NC. Another explanation of false positive Ab-ELISA test for NC could be associated to cross reactivity to other infectious agents<sup>11</sup>. This hypothesis was not acceptable because the patients in this group presented different kinds of diseases: infectious (viral and bacterial meningitis) but also non-infectious (stroke, tumor and polineuropathy).

We used the ROC curve to compare the sensitivity and specificity of the CSF parameters for the groups A (NC) and B (false-positive for NC), in sense of to choose a best cut-point. Based on our findings, it was demonstrated a greater probability of CSF false-positive reactions in Ab-ELISA test for NC (using *T. solium* antigens) in the cases of pleocytosis higher than 7 cells/mm<sup>3</sup> or protein concentration in CSF higher than 60 mg/dL.

Several studies have been conducted in order to improve the diagnosis of NC<sup>2,6</sup>. Analysis of the integrity of the blood-CSF barrier function has contributed to determine the intrathecal synthesis of antibody. In addition, purified larval *Taenia* antigens from homologous (*T. solium*) or heterologous (*T. crassiceps*) parasites have been obtained and characterized in order to obtain reagents with high degree of specificity<sup>6,17-19</sup>. Antigen preparations with contamination of pig proteins, a common problem when *T. solium* cysts are used, are avoided using antigens obtained from larvae of *T. crassiceps*<sup>2,19,20</sup>.

As a retrospective study, we had some limitations, such as the absence of paired serum samples to compare the specific serum and CSF antibodies. However, the Ab-ELISA assay (using *T. solium* antigens) in serum is not a good test for the diagnosis of NC, due the presence of high frequency of false-positive reactions. We used the Sotelo's criteria for the diagnosis of NC, considering it more appropriate for the kind of study. It is based predominantly on clinical and imaging features<sup>1</sup>.

Here, we demonstrated that the CSF findings may influence the immunoreactivity of the CSF ELISA test for NC. CSF reactive patients without NC had higher frequency of blood-CSF dysfunction, elevated level of protein concentration, pleocytosis and red blood cells count in comparison to the CSF reactive patients with NC (true positive). The most frequently findings were the high level of protein and blood-CSF barrier dysfunction. These may contribute to the serum proteins that bind to cysticercus *T. solium* antigens<sup>5</sup> passage to the CSF, conducting to false positive reaction. In addition, we also proposed a cut-point for the protein concentration and pleocytosis. The chance of false-positive Ab-ELISA for NC increases with the concentration of protein higher than 60 mg/dL (sensitivity of 83% and a specificity of 80%) and pleocytosis higher than 7 cells/mm<sup>3</sup> (sensitivity of 77.8% and specificity of 64%). Thus, the results of the Ab-ELISA tests should be carefully considered in together with other clinical, laboratorial and epidemiological data for the diagnosis of NC. Confirmatory tests for CSF should be included in the routine diagnosis criteria for NC.

**Acknowledgments** – The authors thank Mrs. Rosângela Noé from “Comissão de Investigação Científica do HUCFF/ UFRJ” for the statistical analysis of this study.

## REFERENCES

- Sotelo J, Del Butto OH. Review of neurocysticercosis. *Neurology Focus* 2002;12:1-7.
- Machado LR, Livramento JA, Vaz AJ, et al. IgG intrathecal synthesis and specific antibodies index in patients with neurocysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:395-399.
- Sotelo J, Guerrero V, Rubio F. Neurocysticercosis: a new classification base on active and inactive forms. *Arch Intern Med* 1985;145:442-445.
- Del Brutto OH, Rajsherkhar V, White AC Jr, et al. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology* 2001;57:177-183.
- Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis. *J Infect Dis* 1989;159:50-59.
- Ito A, Plancarte A, Ma L, et al. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:291-294.
- Peraña-Narvez JV, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, Garcia-Jeronimo RC, Correa D. Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:2115-2118.
- Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S. Serodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Trop* 2003;87:79-86.
- Vaz AJ, Livramento JA. Neurocysticercose. In Ferreira AW, Avila SLM (eds). *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas*, 2.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001:316-322.
- Katti MK. Assesment of antibody responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid of chronic meningitis patients for definitive diagnosis as TBM/NCC by passive hemagglutination and immunoblot assays. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;33:57-61.
- Gekeler F, Einchenlaub S, Mendonza EG, Sotelo J, Hoelscher M, Hoschen T. Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21:227-229.
- Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantification of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chem* 1987;163:319-328.
- Adams RD, Victor M, Ropper AH. *Principles of neurology*. International Edition New York: MC Graw-Hill, 2001.
- Mc Donald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-127.
- Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001;184:101-122.
- Vaz AJ, Ferreira AW, Silva MV, et al. Teste imunoenzimático para pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em líquidos cefalorraquianos de pacientes com meningites de etiologia indeterminada. *Rev Inst Med Trop Med São Paulo* 1990;32:196-203.
- Peralta RH, Vaz AJ, Pardini A, et al. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Act Trop* 2002;83:159-168.
- Pardini AX, Peralta RH, Vaz AJ et al. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. *Clin Diag Immunol* 2002;9:190-193.
- Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, et al. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticercus effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:926-928.
- Bueno EC, Vaz AJ, Machado LR, Livramento JA, Miele SR. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides of neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38:146-151.