



ARTIGO ORIGINAL

Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis^{☆,☆☆}



Jaqueline Dario Capobianco^{a,*}, Thaís Cabral Monica^b, Fernanda Pinto Ferreira^c, Regina Mitsuka-Breganó^d, Itamar Teodorico Navarro^d, João Luis Garcia^d e Edna Maria Vissoci Reiche^e

^a Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica, Londrina, PR, Brasil

^b Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Londrina, PR, Brasil

^c Universidade Estadual de Londrina (UEL), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, Londrina, PR, Brasil

^d Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Londrina, PR, Brasil

^e Universidade Estadual de Londrina (UEL), Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Londrina, PR, Brasil

Recebido em 13 de outubro de 2015; aceito em 16 de fevereiro de 2016

KEYWORDS

Congenital
Toxoplasmosis;
Western Blotting;
Diagnosis;
Serology

Abstract

Objective: To evaluate the Western blotting method for the detection of IgG anti-*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (IgG-WB) in the serum of children with suspected congenital toxoplasmosis.

Methods: We accompanied 47 mothers with acquired toxoplasmosis in pregnancy and their children, between June of 2011 and June of 2014. The IgG-WB was done in house and the test was considered positive if the child had antibodies that recognized at least one band on IgG blots different from the mother's or with greater intensity than the corresponding maternal band, during the first three months of life.

Results: 15 children (15.1%) met the criteria for congenital toxoplasmosis and 32 (32.3%) had the diagnosis excluded. The symptoms were observed in 12 (80.0%) children and the most frequent were cerebral calcification in 9 (60.0%), chorioretinitis in 8 (53.3%), and hydrocephalus in 4 (26.6%). IgM antibodies anti-*T. gondii* detected by chemiluminescence (CL) were found in 6 (40.0%) children and the polymerase chain reaction (PCR) for detection of *T. gondii* DNA was positive in 5 of 7 performed (71.4%). The sensitivity of IgG-WB was of 60.0% [95% confidence interval (CI) 32.3–83.7%] and specificity 43.7% (95% CI 26.7–62.3%). The sensitivity of IgG-WB

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.02.014>

[☆] Como citar este artigo: Capobianco JD, Monica TC, Ferreira FP, Mitsuka-Breganó R, Navarro IT, Garcia JL, et al. Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. J Pediatr (Rio J). 2016;92:616–23.

^{☆☆} Estudo feito na Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: jaquedc@uel.br (J.D. Capobianco).

increased to 76.0 and 89.1% when associated to the research of IgM anti-*T. gondii* or PCR, respectively.

Conclusions: The IgG-WB showed greater sensitivity than the detection of IgM anti-*T. gondii*; therefore, it can be used for the diagnosis of congenital toxoplasmosis in association with other congenital infection markers.

© 2016 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Pediatria. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

PALAVRAS-CHAVE

Toxoplasmose
Congênita;
Western blotting;
Diagnóstico;
Sorologia

Avaliação do método *Western Blotting* para diagnóstico de toxoplasmose congênita

Resumo

Objetivo: Avaliar o método *Western Blotting* para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (IgG-WB) no soro de crianças com suspeita de toxoplasmose congênita.

Métodos: Acompanhamos 47 mães com toxoplasmose adquirida na gravidez e seus filhos, entre junho de 2011 e junho de 2014. O IgG-WB foi feito internamente e o teste foi considerado positivo quando a criança apresentava anticorpos que reconheciam pelo menos uma banda nas manchas de IgG diferente das bandas da mãe ou com maior intensidade do que a banda materna correspondente, durante os primeiros 3 meses de vida.

Resultados: Atenderam aos critérios para diagnóstico de toxoplasmose congênita 15 crianças (15,1%) e 32 (32,3%) tiveram o diagnóstico excluído. Os sintomas foram observados em 12 crianças (80%) e os mais frequentes foram calcificação cerebral em nove (60%), coriorretinite em oito (53,3%) e hidrocefalia em quatro (26,6%). Os anticorpos IgM anti-*T. gondii* detectados por quimiluminescência (QL) foram encontrados em seis crianças (40%) e a reação em cadeia da polimerase (RCP) para detecção do DNA de *T. gondii* foi positiva em cinco de sete reações (71,4%). A sensibilidade do IgG-WB foi de 60% [intervalo de confiança (IC) de 95%, 32,3 a 83,7%] e a especificidade foi de 43,7% (IC de 95%, 26,7 a 62,3%). A sensibilidade do IgG-WB aumentou para 76 e 89,1% quando relacionada à pesquisa de IgM anti-*T. gondii* ou à RCP, respectivamente.

Conclusões: O IgG-WB mostrou maior sensibilidade do que a detecção de IgM anti-*T. gondii*; portanto, pode ser usado para o diagnóstico de toxoplasmose congênita em associação com outros marcadores de infecção congênita.

© 2016 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Sociedade Brasileira de Pediatria. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A maioria das crianças com toxoplasmose congênita (TC) não demonstra sinais ou sintomas no nascimento. Ainda assim, há um risco de desenvolver sequelas tardias, principalmente comprometimento ocular e neurológico.¹

Todas as crianças cujas mães tiveram toxoplasmose aguda no curso da gravidez são consideradas suspeitas; portanto, devem ser submetidas a uma investigação sorológica com detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*).^{1,2}

Contudo, um diagnóstico sorológico que confirme a infecção por *T. gondii* por meio da detecção de anticorpos específicos IgM e/ou IgA contra o parasita não ocorre em todos os recém-nascidos.^{1,3-5} Portanto, os anticorpos IgG contra o *T. gondii* em amostras de soro em série devem ser analisados e a criança deve continuar sob acompanhamento ambulatorial, que pode levar meses até a definição do diagnóstico.^{1,6}

Em um feto infectado, os anticorpos IgG e IgM produzidos contra os determinantes antigênicos de *T. gondii* poderão diferir dos anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* detectados no soro materno, o que sugere uma neossíntese de anticorpos específicos. Assim, crianças com TC com não reatividade em testes convencionais para detecção de IgM foram

diagnosticadas nos primeiros meses de vida por meio do método *Western Blot* (WB).⁷⁻⁹

Existe a necessidade de um diagnóstico precoce e rápido com um método de baixa complexidade que permita que os laboratórios de referência em toxoplasmose diferenciem os resultados duvidosos obtidos com os métodos sorológicos convencionais de rotina, como imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunossorvente ligado a enzima (Elisa) e imunoenensaio de micropartículas com quimiluminescência (QL).

O objetivo deste estudo foi avaliar o método WB para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* (IgG-WB) no soro da criança e de sua mãe com toxoplasmose adquirida na gravidez para ajudar no diagnóstico precoce de TC.

Métodos

Indivíduos

A população era composta de mulheres com suspeita de toxoplasmose adquirida na gravidez e seus filhos, tratados no Ambulatório Pediátrico de Doenças Infecciosas, entre junho de 2011 e junho de 2014. Incluímos crianças cujas mães demonstraram reatividade ao IgM anti-*T. Gondii* durante

o cuidado pré-natal. As amostras de sangue dos pares criança/mãe foram coletadas simultaneamente durante os primeiros 3 meses de vida da criança e armazenadas a -20°C para o WB. O grupo de controle consistia em crianças cujas mães mostraram suspeita de toxoplasmose aguda durante a gravidez, mas não atendiam aos critérios para TC.^{2,10,11} Nesse período, 47 crianças e suas mães foram monitoradas. Dessas, 15 (15,1%) crianças foram diagnosticadas com TC e em 32 (32,3%) esse diagnóstico foi excluído. As grávidas receberam espiramicina ou sulfadiazina mais pirimetamina e ácido fólico até o nascimento da criança. As crianças com suspeita de infecção receberam sulfadiazina mais pirimetamina e ácido fólico até a definição do diagnóstico.

Critérios de diagnóstico em crianças

Consideramos a TC quando a criança apresentou elevação de títulos específicos de IgG anti-*T. gondii* em amostras sequenciais nos primeiros meses de sua vida e/ou a persistência de títulos de IgG anti-*T. gondii* após 12 meses de vida e/ou reatividade para IgM anti-*T. gondii* e/ou coriorretinite e/ou lesão do sistema nervoso central (SNC) com reatividade para IgG e/ou positividade para o DNA de *T. gondii* com reação em cadeia da polimerase (RCP).^{2,10,11}

Teste sorológico para detecção de IgM e IgG anti-*T. gondii*

Os testes sorológicos durante o cuidado pré-natal e em amostras de crianças foram feitos por métodos laboratoriais de rotina convencionais. Os anticorpos IgG anti-*T. gondii* foram determinados por imunofluorescência indireta (IFI)¹² (Immunoblot, Biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), com *T. gondii* obtidos do fluido ascítico de ratos infectados, e quimioluminescência (QL) (Architect, Sistema Abbott, Wiesbaden, Alemanha) com antígenos recombinantes de *T. gondii* p30 (SAG1) e p35 (GRA8). Os anticorpos IgM anti-*T. gondii* também foram detectados com QL (Architect, Sistema Abbott, Wiesbaden, Alemanha) com antígeno p30 e lisado total de *T. gondii*.

Antígenos de *T. gondii*

Cinco ratas albinas entre 45 e 60 dias e entre 25 e 40 g foram usadas na obtenção de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com uma suspensão de taquizoítos vivos ($10^5/\text{mL}$) em uma solução salina estéril. O exsudato foi obtido 48 horas após a inoculação por meio da lavagem da cavidade peritoneal com 3 mL de solução salina estéril. As amostras passaram por uma agulha 27G para ruptura das células do hospedeiro. Então, foram centrifugadas e o sedimento foi padronizado a 10^9 taquizoítos/mL por meio da contagem em uma câmara de Neubauer.¹³

Método IgG-Western blotting

As proteínas de *T. gondii* a serem usadas no IgG-WB foram quantificadas com o método de Lowry et al.¹⁴ e o gel de poliacrilamida 12% foi usado na separação eletroforética de

proteínas com a transferência subsequente das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (iBlot® Gel Transfer System, Califórnia, EUA). O papel de nitrocelulose foi manchado com Ponceau e, após lavagem com água destilada, as tiras de nitrocelulose foram cortadas e bloqueadas com leite desnatado a 5% mais Tween® salina tamponada com Tris (TBS) (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Posteriormente, lavamos as tiras com TBS e leite desnatado a 5% e, então, adicionamos o soro do paciente diluído em Tween TBS (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e leite desnatado a 5%, lavamos e adicionamos conjugado IgG anti-humano (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA) diluído em Tween TBS e leite desnatado a 5%. Após lavagens adicionais, adicionamos o substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) a 0,2% (Acrös Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Bélgica) e peróxido de hidrogênio ($100\ \mu\text{L}$). Quando as bandas foram visualizadas, a reação foi interrompida com água destilada. As amostras de controle positivo e negativo de anti-*T. gondii* foram incluídas em cada teste.

O teste foi considerado positivo no caso de a criança ter produzido anticorpos que reconheceram no mínimo uma banda de proteínas diferente da mãe ou com maior intensidade do que a banda materna correspondente (fig. 1), o que caracterizou a neossíntese de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.¹⁵⁻¹⁸ Para controlar a subjetividade da leitura, dois observadores independentes leram os padrões do IgG-WB às cegas e sem o conhecimento dos resultados sorológicos anteriores dos testes convencionais; houve concordância em 100% dos resultados.

A especificidade do método IgG-WB foi determinada com 26 amostras séricas obtidas de indivíduos soronegativos para toxoplasmose (anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* não reativos com QL) e com sororreatividade a anticorpos com relação a outros patógenos, como *Treponema pallidum* (n=5), *Trypanosoma cruzi* (n=5), *Leishmania* spp (n=2), *Paracoccidioides brasiliensis* (n=5) ou sororreatividade a marcadores sorológicos de doenças autoimunes, como anticorpos antinucleares (n=5) e anticorpos anti-DNA de cadeia dupla (n=4).

Uso da reação em cadeia da polimerase para detecção do DNA de *T. gondii*

O DNA foi extraído de células sanguíneas periféricas de crianças, coletado com o etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante, até três meses após o nascimento, com o kit EasyPrep DNA Mini I (EasyGen, Favorgen Biotech, Áustria). A amplificação do DNA de *T. gondii* foi feita com o método descrito por Homan et al.¹⁹ Os Primers Tox4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e Tox5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) foram usados para amplificação de um fragmento de 529 pares de base (pb) (GenBank n° AFI46527) do DNA de *T. gondii*. A RCP foi feita em um volume final de $22,5\ \mu\text{L}$, com $2,5\ \mu\text{L}$ de DNA extraído da amostra; $1\ \mu\text{L}$ de $1\ \text{mM}$ para cada primer, $100\ \text{mM}$ de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA), $60\ \text{mM}$ de Tris-HCl (pH 9), $15\ \text{mM}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $2\ \text{mM}$ de MgCl_2 e $0,25\ \mu\text{L}$ de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA), também finalizada com $7,75\ \mu\text{L}$ de água Milli Q. A amplificação foi feita com 35 ciclos em um termociclador PTC-100 (MJ Research,

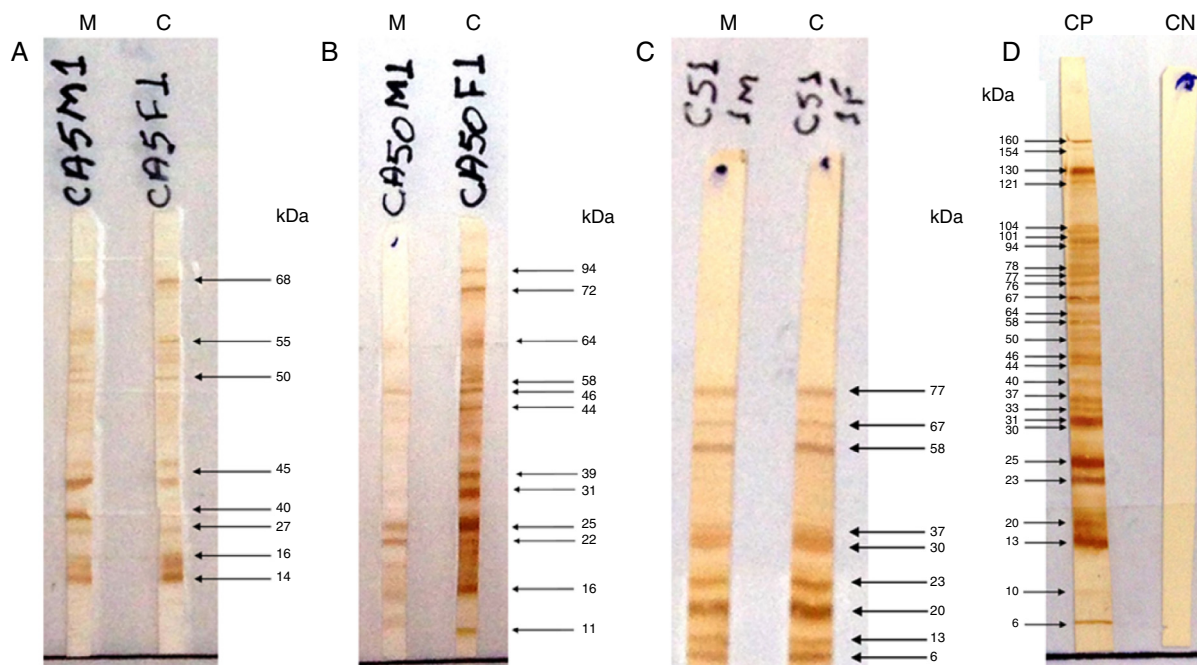


Figura 1 Reconhecimento padrão de proteínas de cepas RH de *Toxoplasma gondii* por anticorpos IgG com o método *Western Blotting* (IgG-WB) em amostras de soro de mães com toxoplasmose adquirida durante a gravidez e seus filhos com suspeita de toxoplasmose congênita. A, IgG-*Western Blotting* positivo para toxoplasmose congênita. Bandas iguais reconhecidas por anticorpos IgG com intensidade mais forte na amostra da criança em comparação com a amostra materna. B, IgG-*Western Blotting* positivo para toxoplasmose congênita. Bandas diferentes reconhecidas por IgG da amostra da criança em comparação com a amostra materna. C, IgG-*Western Blotting* negativo para toxoplasmose congênita. Bandas iguais reconhecidas por anticorpos IgG de amostras da criança e da mãe. M, mãe; C, criança; CP, controle positivo; CN, controle negativo.

CA, EUA), com a seguinte condição de ciclo: 7 minutos a 94°C para desnaturação no 1º ciclo, seguido de 33 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 55°C para emparelhamento e 1 minuto a 72°C para extensão; o ciclo 35 foi seguido por uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Uma amostra de cada produto da RCP foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 2%. O DNA de cepas RH de taquizoítos (10^7 /mL) foi extraído para ser usado como controle positivo. A água foi considerada o controle negativo. Amostras dos controles positivos e negativos para *T. gondii* foram incluídas em cada teste.

Análise estatística

Foi feita no GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As variáveis categóricas foram expressas em um número absoluto (n) e um percentual (%) e analisadas pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher. Foram calculados parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) com intervalo de confiança (IC) de 95%. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. Todas as mães participaram voluntariamente e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Resultados

Das 15 crianças com TC, 12 (80%) eram sintomáticas e atendiam aos critérios clínicos para definição da doença (nove com calcificação cerebral, oito com coriorretinite e quatro com hidrocefalia), seis (40%) apresentaram reatividade a IgM anti-*T. gondii*, cinco (33,3%) apresentaram elevação nos níveis de IgG anti-*T. gondii* nos primeiros meses de vida e uma delas (6,7%) mostrou persistência de títulos de IgG anti-*T. gondii* em amostras sequenciais. Cinco das sete crianças (71,4%) submetidas à PCR para detectar DNA de *T. gondii* apresentaram resultados positivos (tabela 1).

Entre as 15 crianças com TC, o teste IgG-WB foi positivo em nove (60%) e entre as 32 crianças sem TC o teste foi positivo em 18 (56,3%), o que resultou em uma sensibilidade de 60% (IC de 95%, 32,3 a 83,7%), especificidade de 43,7% (IC de 95%, 26,4 a 62,3%), VPP de 33,3% (IC de 95%, 16,5 a 54,0%) e VPN de 70% (IC de 95%, 45,7 a 88,1%) ($p = 0,05875$). Entre as crianças com TC, duas apresentaram IgG-WB negativo e IgM anti-*T. gondii* positivo; cinco apresentaram IgG-WB positivo e IgM anti-*T. gondii* negativo; quatro apresentaram ambos os testes positivos e quatro apresentaram ambos os testes negativos.

O peso molecular (PM) da proteína reconhecida pelo IgG anti-*T. gondii* no soro de crianças com TC variou de 2 a 94 kDa e o PM das proteínas reconhecidas pelos anticorpos IgG no soro das crianças não infectadas variou de 1 a 160 kDa. Entre as nove crianças diagnosticadas por meio do IgG-WB,

Tabela 1 Características clínicas e laboratoriais de 15 crianças com toxoplasmose congênita de junho de 2011 a junho de 2014

Caso	IgM anti- <i>T. gondii</i>	RCP	Primeira amostra de IgG ^a		IgG seguintes ^b	Western Blotting ^b	Sinais e sintomas no 1º mês de vida
			IFI	QL			
1	Negativo	NR	1:512.000	NR	↓	Negativo	coriorretinite + calcificação + hidrocefalia
2	Positivo	NR	1:32.000	926,8	↑	Positivo	coriorretinite + calcificação
3	Positivo	NR	1:512.000	NR	↓	Positivo	vitrite (coriorretinite após) + calcificação + hidrocefalia
4	Negativo	NR	< 1:16	NR	↑	Positivo	coriorretinite
5	Negativo	NR	1:1024	162,0	↔	Positivo	calcificação
6	Negativo	Positivo	NR	200,0	↑	Positivo	assintomático
7	Negativo	Positivo	1:32.000	147,5	NR	Negativo	hidrocefalia
8	Negativo	Negativo	1:8.000	312,0	↑	Negativo	assintomático
9	Negativo	Positivo	1:512.000	175,6	↓	Negativo	assintomático
10	Positivo	Positivo	1:512.000	188,1	↓	Positivo	coriorretinite
11	Negativo	Positivo	1:32.000	139,8	NR	Positivo	calcificação
12	Positivo	Negativo	NR	84,8	↑	Negativo	vitrite + calcificação
13	Positivo	NR	NR	200,0	NR	Positivo	coriorretinite + calcificação
14	Negativo	NR	NR	173,9	↓	Positivo	coriorretinite + calcificação + hidrocefalia
15	Positivo	NR	NR	1655,0	↓	Negativo	coriorretinite + calcificação

IFI, Imunofluorescência indireta para detecção de IgG anti-*T. gondii*; NR, não realizada; QL, imunoenensaio quimioluminescente de micropartículas para detecção de IgG anti-*T. gondii*, expresso em UI/mL; RCP, reação em cadeia da polimerase para detecção do DNA de *Toxoplasma gondii*; ↑, aumento nos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro em série; ↔, persistência de níveis de IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro durante o acompanhamento; ↓, redução de anticorpos.

^a Amostra coletada no 1º mês de vida.

^b Amostra coletada nos primeiros 3 meses de vida, com todas as crianças em tratamento.

sete apresentaram bandas diferentes daquelas observadas no soro materno e duas apresentaram bandas de maior intensidade do que aquelas apresentadas pelas amostras de suas mães. As bandas dominantes reconhecidas pelos anticorpos IgG em amostras de crianças com TC e em crianças não infectadas são apresentadas na [figura 2](#).

Quanto às 26 amostras de pacientes com outras doenças, duas não apresentaram reatividade e 24 apresentaram

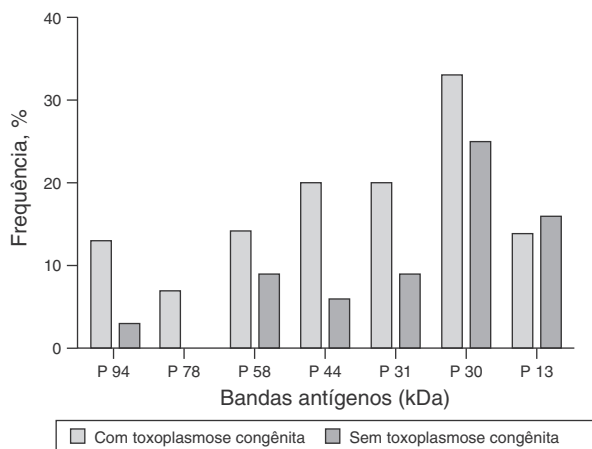


Figura 2 Distribuição das proteínas de *Toxoplasma gondii* mais frequentes reconhecidas por anticorpos IgG no soro de crianças com toxoplasmose congênita e crianças sem a doença, de acordo com seu peso molecular (kDa) ($p > 0,05$ para todas as proteínas reconhecidas).

reatividade de anticorpos IgG, que reconheceram proteínas com PM entre 17 e 118 kDa. As proteínas reconhecidas com mais frequência foram p22 (11/40,7%), p34 (9/33,3%), p38 (8/29,6%), p94 (6/22,2%), p56 (5/18,5%) e p30 (5/18,5%).

A análise dos resultados de IgM anti-*T. gondii* com QL apresentou sensibilidade de 40% (IC de 95%, 16,3 a 67,6%), especificidade de 100% (IC de 95%, 89,1 a 100%), VPP de 100% (IC de 95%, 54,1 a 100%) e VPN de 78,1% (IC de 95%, 62,4 a 89,4%) ($p = 0,0005$). No que diz respeito à detecção do DNA do parasita com RCP, a sensibilidade foi de 71,4% (IC de 95%, 29 a 96,3%), especificidade de 100% (IC de 95%, 69,2 a 100%), VPP de 100% (IC de 95%, 47,8 a 100%) e VPN de 83,3% (IC de 95%, 51,6 a 98%) ($p = 0,0034$).

A sensibilidade e a especificidade do IgG-WB, quando relacionadas a outros marcadores de TC, como a presença de IgM anti-*T. gondii*, RCP positiva e sintomas clínicos, são apresentadas na [tabela 2](#).

O IgG-WB foi positivo em seis dos nove pacientes (66,7%) com lesões oculares e em três dos seis pacientes (50%) com TC sem lesões oculares ($p = 0,6224$), com sensibilidade de 66,7% (IC de 95%, 29,9 a 92,5%), especificidade de 50% (IC de 95%, 11,8 a 88,2%), VPP de 66,7% (IC de 95%, 29,9 a 92,5%) e VPN de 50% (IC de 95%, 11,8 a 88,2%).

Discussão

O diagnóstico da TC é um desafio na prática clínica, porque a sensibilidade do IgM anti-*T. gondii* com métodos sorológicos

Tabela 2 Sensibilidade e especificidade do método *Western Blotting* para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii* (IgG-WB), IgM anti-*Toxoplasma gondii*, reação em cadeia da polimerase (RCP) ao *Toxoplasma gondii* e presença de sintomas clínicos compatíveis com a toxoplasmose congênita, avaliados em série e paralelamente, de acordo com a presença ou ausência de toxoplasmose congênita

Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
IgG-WB +	60	43,7
IgM <i>T. gondii</i> +	40	100
IgM anti- <i>T. gondii</i> ou IgG-WB +	76	43,7
IgM anti- <i>T. gondii</i> e IgG-WB +	24	100
RCP +	71,7	100
RCP + ou IgG-WB +	89,1	43,7
RCP + e IgG-WB +	42,6	100
Sintomas +	80	100
Sintomas + ou IgG-WB +	92	43,7
Sintomas + e IgG-WB +	48	100

IgG-WB, *Western Blotting* para diagnóstico de infecção congênita com detecção de anticorpos IgG; IgM anti-*Toxoplasma gondii* detectado por quimiluminescência; Sintomas, presença de sintomas e/ou sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose congênita; + teste positivo

convencionais varia amplamente, de 48,3% a 75%.³⁻⁵ A ausência de IgM anti-*T. gondii* pode ser justificada pelo fato de a infecção fetal ter ocorrido no início da gravidez ou como resultado de o tratamento materno para toxoplasmose ter sido feito durante os dois primeiros trimestres de gravidez, o que teria causado o bloqueio da resposta imune ou seu atraso.²⁰ Ademais, o atraso ou a ausência de resposta imune detectável por métodos padrão (dosagem de IgG e IgM ou WB) pode estar relacionado a diferenças na resposta imune individual. Outra desvantagem desse marcador é o atraso na coleta de amostras, com positividade reduzida de IgM depois dos primeiros 30 dias de vida.²¹ Assim, muitas vezes é necessário monitorar os resultados sorológicos com a identificação de títulos estáveis ou crescentes de IgG anti-*T. gondii*, que atrasam o diagnóstico e causam incerteza à família.¹⁶ Nesse contexto, o IgG-WB pode ser usado para comparar os padrões de anticorpos com o *T. gondii* em amostras de soro das mães e de seus filhos e para determinar se os anticorpos são transmitidos passivamente ou sintetizados pelo feto ou neonato em casos de TC.¹⁵

Outros autores observaram uma maior contribuição do IgG-WB para o diagnóstico de TC nos primeiros meses de vida.^{22,23} Além disso, a associação do IgG-WB com outros métodos sorológicos pode aumentar a probabilidade do diagnóstico. Em uma coorte de crianças, a sensibilidade do IgG-WB era de 82,4% e aumentou para 85,7% quando o IgG-WB era associado à presença dos anticorpos IgM e/ou IgA anti-*T. gondii* com o Elisa.¹⁶ Outro estudo mostrou que a combinação dos testes de imunocaptura de IgA e IgM, a análise dos padrões do WB para IgG e IgM e a combinação das duas técnicas permitiram a detecção de 94%, 94% e 100% dos casos, respectivamente.²⁴

Os resultados do IgG-WB obtidos no presente estudo estão próximos daqueles encontrados por outros autores, que relataram uma sensibilidade de 73,5%.¹⁸ Esses mesmos autores relataram que a combinação de IgG-WB e IgM-WB aumentou a sensibilidade para 86,5%.¹⁸

A sensibilidade mais baixa obtida neste estudo pode ser explicada, em parte, devido ao fato de todos os pacientes com suspeita de TC terem sido tratados com sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico durante a investigação, o que poderia inibir a neossíntese de anticorpos.²⁰

Outra estratégia para melhorar a sensibilidade desse método proposto é a repetição do IgG-WB durante os primeiros 3 meses de vida.⁸ Em um estudo com coleta de amostras no nascimento, a sensibilidade do anticorpo IgM anti-*T. gondii* por métodos convencionais (reação de aglutinação por imunoabsorção [Isaga] e Elisa) foi de 52% e pelo método WB (com IgG e IgM), de 67%. Ao combinar ambos os métodos, a sensibilidade aumentou para 78% no nascimento e 85% nos primeiros 3 meses de vida, com detecção de 94% dos casos de TC.¹⁷

Neste estudo, analisamos algumas amostras sequenciais do IgG-WB. Entre as crianças infectadas com resultado falso negativo na primeira amostra segundo o método IgG-WB, duas de seis (33,3%) reconheceram proteínas diferentes em comparação com a amostra materna na segunda coleta, o que caracterizou a neossíntese de IgG anti-*T. gondii* e justifica a necessidade da repetição do IgG-WB em amostras em série.

Em uma análise anterior, o momento da coleta da amostra materna influenciou o resultado do teste IgG-WB, pois as mães que receberam tratamento para toxoplasmose durante a gravidez podem deixar de reagir aos antígenos de *T. gondii* no período posterior ao nascimento, com resultado falso negativo.¹⁶ Neste estudo, esse fenômeno foi observado em uma mãe de uma criança infectada. Contudo, a maior parte das mães apresentou um aumento no número de bandas reconhecidas nas amostras coletadas imediatamente após a interrupção do tratamento no parto.

Em um estudo anterior, o PM de bandas antigênicas reconhecidas pela IgG de neonatos com TC variou entre 21 e 116 kDa.¹⁸ Neste estudo, semelhantemente aos dados encontrados por outros autores,^{15,16} os anticorpos encontrados com alta frequência em crianças infectadas foram aqueles relacionados às proteínas de PM maiores do que 30 kDa. As diferenças no PM de proteínas reconhecidas relatadas em estudos anteriores podem ser explicadas por diferentes exigências metodológicas, como a preparação do antígeno de *T. gondii*, as condições da eletroforese em gel de acrilamida e as diluições de soro.²⁰ Outra explicação é a diversidade genética entre as cepas de *T. gondii*, o que pode levar ao reconhecimento de diferentes proteínas, além do fato de alguns indivíduos apresentarem IgG que reconhece várias proteínas, ao passo que outros apresentam IgG que reconhece uma única proteína.²⁵

Neste estudo, o IgG-WB também foi útil na demonstração da síntese ativa de IgG anti-*T. gondii* em pacientes com IgG não reativa pelos métodos convencionais. No Paciente 4, com títulos de IgG anti-*T. gondii* < 1:16, por IFI, na primeira amostra e com um ligeiro aumento em amostras sequenciais (máximo de 1:64), observou-se o desaparecimento de anticorpos IgG na avaliação pelos métodos de QL e IFI após o tratamento. Contudo, pelo método IgG-WB, foi possível

demonstrar o anticorpo IgG anti-*T. gondii*, que reconheceu as proteínas p22 e p46, ausentes no soro materno. Após 12 meses de vida, essa criança que apresentou cicatrizes coriorretinianas continuou não reativa a anticorpos IgG anti-*T. gondii* avaliados por QL e IFI; contudo, apresentou resultado positivo no IgG-WB.

A TC com não reatividade para IgG e IgM anti-*T. gondii* poderá ser resultante do tratamento de toxoplasmose na mãe e no neonato.²⁰ O tratamento da criança durante um ano após o nascimento também poderá causar anticorpo não reativo. Contudo, na maioria desses casos, há a detecção de IgG anti-*T. gondii* logo após a interrupção do tratamento, denominada efeito rebote.^{1,7,20}

No presente estudo, o Paciente 1 mostrou não reatividade; mas apresentou anticorpos anti-*T. gondii* detectáveis após a interrupção do tratamento. Semelhantemente ao Paciente 4, os pacientes 6, 8 e 9 também mostraram uma queda nos anticorpos até a não reatividade e assim permaneceram após a interrupção do tratamento. Existe a possibilidade de que esses pacientes deixem de reconhecer as proteínas p30 e p35 presentes no teste de QL, o que justifica a não reatividade nesse teste com a evolução da infecção.

Portanto, em vez de avaliar somente a persistência de IgG anti-*T. gondii* por meio de QL, sugerimos o uso do IgG-WB no monitoramento sorológico, pois a criança infectada pode produzir anticorpos contra outras proteínas do parasita e, assim, continuar positiva após 12 meses de idade. Nesse caso, a ausência de IgG anti-*T. gondii* na QL não poderá excluir a TC, o que também justificaria a menor especificidade do IgG-WB encontrada durante este estudo em comparação com estudos anteriores.^{16-18,22,23} Contudo, mais estudos devem ser feitos antes do uso do IgG-WB no monitoramento sorológico.

De acordo com um estudo feito na população brasileira, pacientes com IgM reativa pelo método WB (IgM-WB) mostraram maior risco de lesão macular ativa do que pacientes com IgM-WB negativo.¹⁸ Contudo, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a positividade do IgG-WB e a presença de lesão macular, como neste estudo. Não é elucidado se há proteínas específicas de cepas de *T. gondii* relacionadas a lesões oculares e se elas poderiam explicar a maior frequência de lesões oculares em crianças brasileiras com TC do que em crianças de outros países.²⁶ A principal limitação deste estudo foi a ausência de avaliação das amostras com o IgM-WB, o que poderia melhorar a sensibilidade de diagnóstico do teste.

O procedimento técnico do IgG-WB é de baixa complexidade e de custo disponível, o que o torna viável na rotina laboratorial. A desvantagem do método interno é sua lentidão, que poderia ser reduzida com a padronização de um conjunto de reagentes de fabricação nacional. A semiautomação do método com o uso de um programa para leitura da intensidade da banda visualizada por meio do WB facilitaria a leitura e a reprodutibilidade dos resultados.²⁰

Os resultados reforçam a utilidade do método IgG-WB para avaliação sorológica de pacientes com TC, com maior sensibilidade do que a detecção de IgM anti-*T. gondii* por métodos convencionais. Portanto, o IgG-WB pode ser usado para obter o diagnóstico precoce de TC em combinação com outros marcadores da infecção congênita por *T. gondii*.

Financiamento

Programa de Apoio à Extensão Universitária do Ministério da Educação do Brasil (Proext-MEC/SESU) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

A todos os pacientes e parentes que contribuíram para este trabalho, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UEL.

Referências

1. Remington JS, McLeod R, Wilson CB, Desmonts G. Toxoplasmosis. Em: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editores. Infectious disease of the fetus and newborn infant. 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 918-1041.
1. Remington JS, McLeod R, Wilson CB, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editors. Infectious disease of the fetus and newborn infant. 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 918-1041.
2. American Academy of Pediatrics. Report of committee on infectious diseases. *Toxoplasma gondii* infections (Toxoplasmosis). 28^a ed. Illinois: Elk Grove Village; 2009. p. 667-72.
3. Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, Peitersen B, et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. Danish Congenital Toxoplasmosis Study Group. Lancet. 1999;353:1834-7.
4. Lago EG, Neto EC, Melamed J, Rucks AP, Presotto C, Coelho JC, et al. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. Paediatr Perinat Epidemiol. 2007;21:525-31.
5. Capobianco JD, Mitsuka-Breganó R, Navarro IT, Rezende Neto CP, Casella AM, Lopes-Mori FM, et al. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. Braz J Infect Dis. 2014;18:364-71.
6. Rodrigues IM, Castro AM, Gomes MB, Amaral WN, Avelino MM. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:434-40.
7. Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M, et al. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M and A antibodies. J Clin Microbiol. 2001;39:2267-71.
8. Tissot-Dupont D, Fricker HH, Pinchart MP, Bost-Bru C, Thomas PA, Pelloux H. Usefulness of Western Blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003;22:122-5.
9. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 2004;42:941-5.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde: intervenções comuns, icterícia e infecções. 2^a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2013. p. 109-22.
11. Lebech M, Joynson DH, Seitz HM, Thulliez P, Gilbert RE, Dutton GN, et al. Classification system and case definitions of

- Toxoplasma* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15:799–805.
12. Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop.* 1964;6:117–8.
 13. Lundén A. Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms. *Vet Parasitol.* 1995;56:23–5.
 14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265–75.
 15. Chumpitazi BF, Boussaid A, Pelloux H, Racinet C, Bost M, Fleuret AG. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1479–85.
 16. Gross U, Lüder CG, Hendgen V, Heeg C, Sauer I, Weidner A, et al. Comparative immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC Test) for early diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3619–22.
 17. Rilling V, Dietz K, Krczal D, Knotek F, Enders G. Evaluation of a commercial IgG/IgM western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22:174–80.
 18. Machado AS, Andrade GM, Januário JN, Fernandes MD, Carneiro AC, Carneiro M, et al. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105:757–61.
 19. Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol.* 2000;30:69–75.
 20. Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:504–12.
 21. Lago EG, Oliveira AP, Bender AL. Presence and duration of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M in infants with congenital toxoplasmosis. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90:363–9.
 22. Magi B, Migliorini L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *New Microbiol.* 2011;34:93–5.
 23. L'Ollivier C, Wallon M, Faucher B, Piarroux R, Peyron F, Franck J. Comparison of mother and child antibodies that target high-molecular-mass *Toxoplasma gondii* antigens by immunoblotting improves neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19:1326–8.
 24. Gamgneux FR, Commere V, Schaefer CT, Camet JD. Performance of a Western Blot assay to compare mother and newborn anti-*Toxoplasma gondii* antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18:648–54.
 25. Sun X, Lu H, Jia B, Chang Z, Peng S, Yin J, et al. A comparative study of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in three healthy Chinese populations detected using native and recombinant antigens. *Parasit Vectors.* 2013;6:241–7.
 26. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, et al. European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(e277):1–7.