

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA WESTERN BLOT PARA O DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

EVALUATION OF THE WESTERN BLOT TECHNIQUE FOR THE DIAGNOSIS OF CONGENITAL TOXOPLASMOSIS

EMILLY ANDRADE COTA^{1*}, VALERIA CRISTINA JARDIM¹, MARIA FERNANDA ALVES VIEIRA¹, FERNANDA FREITAS DE OLIVEIRA¹, PRISCILA TEIXEIRA DANTAS¹, LILIAN YATIYO NAKAGAWA DITTMAR^{2*}

1. Acadêmica do curso de graduação do curso Medicina da Faculdade de Minas/BH; 2. Médica pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMED/UFMS).

* Avenida Cristiano Machado, 12001, Vila Clóris, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 3144-007. emillycota@gmail.com

Recebido em 28/08/2019. Aceito para publicação em 17/09/2019

RESUMO

A toxoplasmose é uma protozoonose de grande relevância, que possui uma clínica variável. Apresenta uma forma congênita, que embora seja rara, pode se manifestar de forma assintomática em recém-nascidos ou como lesões graves tardias. Desse modo, ressalta-se a importância do diagnóstico precoce, a fim de evitar sequelas. Teve o objetivo de avaliar o método de Western Blot para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, ressaltando – se a especificidade e a sensibilidade para detecção de anticorpos anti – *Toxoplasma gondii* e sua aplicabilidade na rotina laboratorial. A Busca eletrônica nas bases de dados SciELO e PubMed com recorte temporal nos últimos 5 anos, selecionando – se artigos originais com base na relevância e atualidade dos dados. Os métodos diagnósticos são de suma importância, permitindo a detecção dos anticorpos anti – *T. gondii* e a instauração de um plano terapêutico, minimizando os riscos inerentes a infecção. O Western Blot possui alta especificidade e sensibilidade, sendo um método útil e aplicável na rotina laboratorial.

PALAVRAS-CHAVE: Toxoplasmose congênita, método diagnóstico, Western Blot

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a protozoon of great relevance, which has a variable clinic. It presents a congenital form, which although rare, may manifest asymptotically in newborns or as severe late lesions. Thus, the importance of early diagnosis is emphasized in order to avoid sequelae. Objectives: To evaluate the Western blot method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis, emphasizing specificity and sensitivity for the detection of anti - *Toxoplasma gondii* antibodies and its applicability in the laboratory routine. Methodology: Electronic search in the databases SciELO and PubMed with temporal cut in the last 5 years, selecting original articles based on the relevance and timeliness of the data. Final considerations: Diagnostic methods are extremely important, allowing the detection of anti - *T. gondii* antibodies and the establishment of a therapeutic plan, minimizing the inherent risks of infection. Western Blot has high specificity and sensitivity, being a useful method and applicable in laboratory routine.

KEYWORDS: Congenital toxoplasmosis, diagnostic method, Western Blot

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), com ampla distribuição geográfica e impacto significativo sobre a saúde pública pela gravidade da manifestação congênita e pacientes imunocomprometidos. É considerado que cerca de 1/3 da população seja contaminada com o parasito pela exposição com felinos contaminados, carne malcozida e higiene e preparo dos alimentos, e o desenvolvimento da infecção depende da resposta imunológica do indivíduo¹.

A transmissão pode ser principalmente por via oral e congênita. A maioria das pessoas é assintomática ou apresentam sinais inespecíficos, porém o diagnóstico na gravidez é de suma importância para se prevenir a toxoplasmose congênita. No Brasil², o Ministério da Saúde recomenda a realização da triagem sorológica principalmente em regiões onde a prevalência é elevada e a notificação de doenças e agravos compulsórios para o monitoramento e investigação epidemiológica dos casos congênitos e toxoplasmose gestacional. A toxoplasmose congênita apresenta clínica variável, podendo ter formas graves e até sequelas tardias em pacientes assintomáticos, ressaltando-se a importância do diagnóstico precoce da infecção³.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão de literatura desenvolvida através de uma busca eletrônica na base de dados SciELO, utilizando – se o descritor “toxoplasmose”, obtendo – se um total de 405 artigos. Desse modo, foram estabelecidos critérios de inclusão, tais como: i) o país de origem do estudo deveria ser o Brasil; ii) ser escrito em português ou inglês; iii) recorte temporal nos últimos 5 anos; iv) ser um artigo original. A partir dos filtros estabelecidos, foram alcançados 69 resultados, os quais passaram por nova seleção, usando – se o descritor “toxoplasmose congênita”. Ao final foram obtidos 7 artigos, os quais abordavam outros temas que não correspondiam aos objetivos do artigo. Logo, foi feita uma nova busca usando o termo “toxoplasmose

congênita método diagnóstico western blotting” e assim, foi alcançado 1 resultado.

A mesma busca foi realizada na base de dados PubMed, todavia utilizando – se o descritor “congenital toxoplasmosis western blot” e foram aplicados os seguintes critérios de inclusão: i) ser um estudo realizado em humanos; ii) todo o texto deveria estar disponível; iii) recorte temporal nos últimos 5 anos; iv) ser um ensaio clínico. Foram obtidos 5 resultados.

Ao final da análise dos artigos encontrados, os 6 foram utilizados (Anexo1- Quadro 1)

3. DESENVOLVIMENTO

A toxoplasmose é uma patologia que possui ciclo biológico complexo. Primeiramente, é importante considerar que os gatos e outros felídeos são hospedeiros definitivos, enquanto o homem, aves e outros mamíferos são hospedeiros intermediários. O ciclo se inicia a partir do momento que o gato ingere a presa infectada, contendo cisto em seus tecidos ou pela ingestão de materiais contaminados por oocistos. No intestino do felino ocorre a reprodução sexuada, essencial para a perpetuação do ciclo, de modo que ocorre a liberação de oocistos nas fezes, e posteriormente, no ambiente. Esses oocistos, quando liberados, não se encontram na forma infectante, devendo sofrer um processo de esporulação, que ocorre em até 3 dias devido a exposição ao oxigênio e a temperaturas de 27°C – 30°C para que se tornem infectantes e viáveis por um período de 1 ano, em média⁴.

É importante considerar que a toxoplasmose apresenta três principais formas de infecção que divergem entre si: ingestão de oocistos presentes em materiais contaminados com fezes de gatos infectados, como solo e areia; ingestão de carnes cruas ou malcozidas que contenham cistos de protozoários, como carne de porco ou bovina; e por meio de transmissão transplacentária. É relatada também a transmissão através de transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos infectados. Deve – se considerar que o período de incubação depende da via de transmissão, sendo, portanto, variável. O período de incubação do protozoário é variável, pois depende da forma de transmissão. Se a infecção ocorrer por ingestão de oocistos contidos nas fezes de gatos, o período varia de 5 a 20 dias. Caso a forma de contágio for ingestão de cistos em carnes cruas ou malcozidas, esse tempo é em torno de 10 a 23 dias. Deve-se ressaltar que não há transmissão direta entre pessoas, com exceção à forma vertical. Quando os hospedeiros ingerem oocistos, há liberação de esporozoítos; enquanto na ingestão de cistos, há formação de bradizoítos que se multiplicam lentamente. O *T. gondii* se dissemina através da corrente sanguínea por todo o hospedeiro após a infecção primária de células epiteliais do intestino, onde se formam os taquizoítos que são as formas de proliferação rápida, móveis e que originam cistos nos tecidos. Guiado pelas células dendríticas e macrófagos, este parasito infecta o tecido ocular, uma vez que sozinho

não é capaz de infectar esse órgão-alvo. Além disso, tem a capacidade de atravessar barreiras vasculares, como, por exemplo, a barreira hematoencefálica e formar cistos. Devido à manipulação da sinalização intracelular por parte do parasito, o qual secreta moduladores imunológicos (proteínas ROP e GRA) no citoplasma da célula hospedeira, esta permanece passiva, com poucas alterações do citoesqueleto ou da fosforilação protéica durante a invasão e infecção intracelular. Ao mesmo tempo o *T. gondii* provoca a produção de mediadores pró-inflamatórios (IFN- e IL12) e uma forte supressão da resposta imunológica Th1. Essa resposta imune equilibrada permite a monitorização imunológica do parasito e, simultaneamente, previne uma patologia imunológica. Ademais, as principais células contribuintes para esse equilíbrio imunopatológico no olho são as Th17, as quais produzem IL-17 por intermédio da IL-23 que são secretadas a partir de células dendríticas. A IL-17 tem propriedades ambíguas, atua na destruição tecidual (induz uma resposta pró-inflamatória e doenças autoimunes); entretanto possui atividade antipatogênica, por propriedades neuroprotetoras (inibe o cálcio intracelular, mantém a homeostase e previne a apoptose em uveíte ativas). Portanto, fatores específicos dos parasitas, bem como dos hospedeiros, são importantes na determinação de uma infecção resultar em manifestação ocular. Esses cistos teciduais podem, no entanto, romper-se em alguns casos e liberar os taquizoítos. A menos que a resposta imune não seja efetiva, a forma de taquizoíto permanece. Esta forma tem alta taxa de replicação e gera lesão tecidual. Quando há lesão no tecido ocular, as estruturas mais afetadas são a retina e a coróide, nas quais podem ser observadas áreas de necrose⁴.

O espectro clínico da toxoplasmose é variável, de modo que os pacientes podem ser assintomáticos ou manifestar sintomas leves, semelhantes a uma virose, como mal-estar, febre e adenomegalia, sobretudo retroauricular. Alguns, manifestam a forma grave da doença, caracterizada pela presença de lesão na retina, que pode culminar ou não na perda de visão.

A toxoplasmose congênita, por sua vez, se manifesta com coriorretinite, cegueira, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, microcefalia, hidrocefalia, abaulamento de fontanela, meningoencefalite, estrabismo, hepatoesplenomegalia, erupção cutânea, petéquias, icterícia e pneumonia.

O diagnóstico é realizado através de exames sorológicos, investiga-se a detecção de anticorpos contra o protozoário das classes IgG, IgM, IgA e IgE. No caso dos pacientes imunocomprometidos, o diagnóstico é realizado, na maioria das vezes, pela detecção do ácido desoxirribonucléico (DNA) do parasito por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), isolamento do parasito e histologia. Desse modo, a fase aguda da infecção é caracterizada pela existência de anticorpos anti *T.gondii* IgM e/ou IgA. O diagnóstico de toxoplasmose aguda sistêmica se dá mediante a verificação de anticorpos anti *T.gondii* IgM no soro. Na fase crônica, encontram-se anticorpos IgG em baixos

níveis e ausência de IgM^{2,4}.

4. DISCUSSÃO

A toxoplasmose congênita se apresenta, em muitos casos, assintomática ao nascimento. Todavia, é possível desenvolver sequelas tardias, sobretudo lesões oculares e neurológicas. Desse modo, é fundamental a investigação sorológica em todas as crianças cujas mães tiveram quadros agudos de toxoplasmose durante a gestação, preferencialmente nos primeiros três meses de vida. É necessário, portanto, analisar os níveis séricos de anticorpos IgG e IgM anti – *Toxoplasma gondii*⁸.

No estudo desenvolvido por Capobianco *et al.* (2016)³ foi avaliado o método de Western Blot (WB) para detecção de anticorpos IgG anti – *Toxoplasma gondii* em uma amostra de 47 mães que adquiriram toxoplasmose durante a gestação e seus filhos. Esse método apresentou uma sensibilidade de 60.0% [95% intervalo de confiança (CI) 32.3 – 83.7%] e uma especificidade de 43,7% (95% CI 26.7 – 62.3%). A sensibilidade, todavia, se tornou maior (76.0%) quando esse método foi associado à análise dos níveis de IgM ou a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Primeiramente, deve – se considerar que nem sempre serão detectados nos recém-nascidos, anticorpos IgM e/ou IgA, de modo a confirmar a infecção. Da mesma forma, a presença de anticorpos IgG deve ser analisada através de amostras seriadas e a criança deve permanecer em acompanhamento ambulatorial, pois o diagnóstico definitivo pode demorar meses.

Ademais, estudos revelam a presença de anticorpos IgG e IgM em fetos infectados, diferentes dos presentes no plasma materno, sugerindo uma nova síntese de anticorpos específicos. Desse modo, ressalta – se a importância da realização do método de Western Blot nos primeiros meses de vida, já que esses anticorpos não reagem em testes convencionais para detecção de IgM.

Com base no estudo desenvolvido, o resultado era considerado positivo se a criança produzisse anticorpos que reconhecessem pelo menos uma banda de proteínas diferente da mãe ou com maior intensidade quando comparado a banda materna correspondente, caracterizando uma nova síntese de anticorpos IgG anti – *T. gondii*. Foi avaliada uma amostra composta por 15 crianças, as quais foram submetidas ao teste de quimioluminescência e apresentaram resultados positivos, sendo essas, sintomáticas e com critérios diagnósticos de toxoplasmose, como hidrocefalia e coriorretinite. O WB foi positivo em 9 dessas, representando 60% do total. Por sua vez, 32 crianças apresentaram resultados negativos no teste de quimioluminescência. Desse total, WB foi positivo em 18 (56.3%). Desse modo, a sensibilidade foi de 60% (95% CI: 32,3% – 83,7%), especificidade de 43.7% (95% CI: 26,4% – 62,3%), valor preditivo positivo (PPV) de 33,3% (95% CI 16,5%– 54,0%) e valor preditivo negativo (VPN) de 70% (95% CI: 45,7% – 88,1%) ($p = 0,05875$).

Ademais, 2 crianças cujo IgG – BLOT foi negativo, apresentaram IgM positivo anti – *T.gondii*, 5

apresentaram IgG – BLOT positivo e IgM anti – *T.gondii* negativo, 4 apresentaram ambos positivos e outras 4 apresentaram ambos os testes negativos.

Entre as 9 crianças que foram diagnosticadas através do IgG – WB, 7 apresentaram bandas diferentes das encontradas no plasma materno e 2 apresentaram bandas de maior intensidade do que aquelas apresentadas pelas amostras maternas. O método de Western Blot tem contribuído para o diagnóstico da toxoplasmose sobretudo nos primeiros meses de vida, segundo relatam alguns autores. Ademais, quando associado a outros métodos sorológicos há maior chance de diagnosticar a infecção. Foram relatados no estudo em questão, outros valores descritos por autores, os quais encontraram uma sensibilidade de 82,4%, a qual aumentou para 85,7% quando associou – se IgG – WB com o IgM e/ou IgA anti – *T. gondii* usando o método ELISA.

Embora os valores tenham sido próximos aos encontrados na literatura, os valores menores do estudo analisado foram explicados com base no fato de essas gestantes avaliadas terem sido tratadas durante a investigação com sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico, os quais possuem a capacidade de inibir a neossíntese dos anticorpos. Outra estratégia que corroborou para aumentar a sensibilidade desse teste foi a repetição nos primeiros três meses de vida. Quando comparado a amostras obtidas ao nascimento a sensibilidade para anticorpos anti – IgM usando métodos convencionais, como ELISA foi de 52% enquanto para o método WB foi de 67.0%. Combinando os dois métodos, a sensibilidade passou para 78% ao nascimento e 85% nos primeiros três meses de vida.

Capobianco *et al* (2016)³, também defendem o uso do método de Western Blot para monitorar os pacientes, que podem produzir anticorpos contra outras proteínas do parasita e até mesmo persistir com resultados positivos após os 12 meses de vida. A técnica de Western Blot também se mostra favorável, por não requerer alta complexidade para realização e por apresentar custo viável, sendo aplicável na rotina laboratorial.

Já em seus estudos, Marangoni *A et al.*(2014)⁵ avaliou um novo protocolo com o objetivo de realizar o diagnóstico retrospectivo da toxoplasmose congênita, usando cartões de Guthrie. Foram avaliados IgM WB, IgA imunoensaio enzimático e à amplificação do DNA por PCR. A amostra era composta por 18 bebês cujas mães adquiriram toxoplasmose durante a gestação, dos quais foram coletados cartões Guthrie com gotas de sangue. Dos métodos realizados, o IgM WB se mostrou o mais sensível.

Deve – se considerar, que quando associado a detecção do DNA, a sensibilidade foi maior, representando 50 % (95% CI – 28,6% - 73,2%). Desse modo, o estudo sugere que nos casos em que o diagnóstico não é feito ao nascimento, a análise dos cartões Guthrie de crianças com clínica compatível de toxoplasmose congênita após o período perinatal, a associação dos dois métodos é uma boa alternativa, contribuindo de forma significativa para o diagnóstico.

Além disso, devido à alta especificidade

demonstrada pelos métodos IgM WB e amplificação do DNA, resultados positivos obtidos por qualquer um desses, podem ser considerados para o diagnóstico.

O estudo transversal desenvolvido por Stajner T *et al.* (2016)⁶ analisou uma amostra constituída por 80 gestantes cujos fetos apresentavam anomalias ou que referiram uma suspeita de infecção pelo *Toxoplasma gondii* durante a gestação e um grupo de 16 mulheres cujos neonatos apresentaram – se sintomáticos no pós-parto. Foram utilizados métodos sorológico, molecular (PCR) e biológico para o diagnóstico pré e pós-natal.

Das mulheres avaliadas, 77,5% foram examinadas em estágios avançados da gestação, sendo que das mulheres infectadas (n=90), 69% tiveram o diagnóstico no período periconceptual.

Dos métodos utilizados, o molecular se mostrou superior aos demais. Todavia, os demais métodos são indispensáveis, sendo que em 7 recém-nascidos foi realizado o imunoenensaio e em 2, o Western Blot.

Quando não há uma triagem sistemática, o diagnóstico tende a ser tardio e até mesmo, ser realizado apenas quando há suspeita de anomalias fetais. Desse modo, o uso do método WB, associado a testes moleculares e biológicos permite o diagnóstico e tratamento materno precoce.

Em seu estudo, Sroka J *et al.* (2016)⁷ realizou testes com soros de 89 mulheres grávidas a fim de determinar a fase de infecção pelo *Toxoplasma gondii*. A seleção do material foi norteada pelos resultados obtidos nos métodos ELFA IgM, IgG e avides IgG. Posteriormente foram submetidos a testes com IgM, IgG e teste de avides IgG de Western Blot. Das 89 amostras, 81 foram positivas tanto no ELFA quanto no WB, pela presença de anticorpos anti – *T.gondii* da classe IgG, indicando uma infecção passada. Do total, 20,2% apenas apresentaram uma infecção recente. Ao final, foi demonstrando a significância desses métodos para o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Arce – Estrada GE *et al.*(2017)⁸ descreveu um caso raro de anoftalmia e fissura craniofacial, sendo a causa provável, a toxoplasmose congênita. Tratava – se de um bebê, que tinha em seu útero, um gêmeo, o qual desapareceu entre a 7^a e a 14^a semana. Não preenchia critérios para síndromes genéticas ou de exposição/deficiência, sendo confirmada a toxoplasmose através da realização dos métodos de Western Blot e PCR.

5. CONCLUSÃO

A toxoplasmose congênita, quando não diagnosticada precocemente pode acarretar sérios danos aos fetos e inclusive, sequelas tardias, dentre as quais se destacam lesões oculares e neurológicas. Desse modo, os métodos diagnósticos são de suma importância, permitindo a detecção dos anticorpos anti – *T. gondii* e a instauração de um plano terapêutico, minimizando os riscos inerentes a infecção.

Dentre os métodos diagnósticos, o Western Blot possui alta especificidade e sensibilidade, sendo um método útil e aplicável na rotina laboratorial, devido aos

menores custos e menor complexidade. Além disso, pode ser associado a outros métodos, a fim de ampliar a sensibilidade e tornar o diagnóstico mais preciso, sendo esse mais um dos fatores que corroboram com o fato de ser uma boa alternativa diagnóstica a ser aplicada.

REFERÊNCIAS

- [1] Silva FWS, *et al.* Toxoplasmose: uma revisão. *Ciência Animal*; 2006; 16(2):71-77.
- [2] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de Notificação e Investigação: Toxoplasmose gestacional e congênita. Brasília, 31 p. 2018.
- [3] Capobiango JD, *et al.* Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Jornal de Pediatria*. 2016; 92(6):616-623.
- [4] Borges RT, *et al.* Toxoplasmose e suas repercussões oftalmológicas – uma revisão. *Rev Med Saude Brasilia*. 2017; 6(2):261-9.
- [5] Marangoni A, *et al.* Evaluation of a New Protocol for Retrospective Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Use of Guthrie Cards. *Journal Of Clinical Microbiology*; 2014; 52(8):2963-2970.
- [6] Stajner T, *et al.* Prenatal and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis in a Setting With No Systematic Screening in Pregnancy. *Medicine*; 2016; 95(9):2979-2979.
- [7] Sroka J, *et al.* Comparison of the efficiency of two commercial kits – ELFA and Western blot in estimating the phase of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Annals Of Agricultural And Environmental Medicine*; 2016; 23(4):570-575.
- [8] Arce-Estrada GE, *et al.* Report of an unusual case of anophthalmia and craniofacial cleft in a newborn with *Toxoplasma gondii* congenital infection. *Bmc Infectious Diseases*. 2017; 17(1):459-459.

Anexo 1

Quadro 1. Sistematização dos artigos selecionados para a revisão integrativa.

Procedência	Título	Autor	Periódico	Considerações
SciELO	Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis	Capobiango JD et al.	J. Pediatr. (Rio J.) vol.92 no.6 Porto Alegre Nov./Dec. 2016	Foram avaliadas 47 mães com toxoplasmose adquirida durante a gestação e seus filhos. O teste era considerado positivo se a criança tivesse anticorpos que reconhecessem pelo menos uma banda do IgG Blot diferente da mãe ou com maior intensidade do que a banda correspondente da mãe, durante os três primeiros meses de vida.
PubMed	Evaluation of a new protocol for retrospective diagnosis of congenital toxoplasmosis by use of Guthrie cards.	Marangoni A et al.	J Clin Microbiol. 2014 Aug; 52(8): 2963–2970	Este estudo avaliou o valor diagnóstico do IgM Western Blot, do IgA imunoenensaio enzimático (EIA) e PCR usando cartões de Guthrie, com o objetivo de estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose retrospectivamente.
PubMed	Prenatal and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis in a Setting With No Systematic Screening in Pregnancy	Stajner T et al.	Medicine (Baltimore). 2016 Mar;95(9):e2979	Estudo transversal realizado com 80 gestantes cujos fetos apresentavam anomalias fetais, ou que referiram uma suspeita infecção por toxoplasmose durante a gestação e 16 mulheres após o parto de neonatos sintomáticos, usando métodos sorológico, molecular e biológico para o diagnóstico pré e pós - natal.
PubMed	Comparison of the efficiency of two commercial kits - ELFA and Western blot in estimating the phase of Toxoplasma gondii infection in pregnant women.	Sroka J et al.	Ann Agric Environ Med. 2016 Dec 23;23(4):570-575	Este estudo avaliou a eficácia dos métodos IgM, IgG e avidéz de Western Blot, através de testes com soros de 89 mulheres, a fim de detectar a fase da infecção.
PubMed	Report of an unusual case of anophthalmia and craniofacial cleft in a newborn with Toxoplasma gondii congenital infection	Arce – Estrada GE et al.	BMC Infect Dis. 2017 Jul 3;17(1):459	Este estudo, relata um caso incomum de anofthalmia e fissuracraniofacial, sendo a toxoplasmose congênita, a provável causa.

Fonte: elaborado pelos autores.