



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THAÍS CABRAL MONICA

**APLICABILIDADE DO MÉTODO DE *WESTERN BLOT* PARA
DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

THAÍS CABRAL MONICA

**APLICABILIDADE DO MÉTODO DE *WESTERN BLOT* PARA
DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro

Londrina
2019

THAÍS CABRAL MONICA

**APLICABILIDADE DO MÉTODO DE *WESTERN BLOT* PARA
DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Jaqueline Dario Capobiango
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Regina Mitsuka Breganó
Universidade Estadual de Londrina – Hospital
Veterinário - UEL

Prof.^a Dr.^a Edna Maria Visoci Reiche –
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy –
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de março de 2019.

*Dedico este trabalho
a todas as mães e seus filhos
envolvidos nesse projeto.
Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, pela força e por todo conhecimento que adquiri e ainda tenho ter nessa longa caminhada do conhecimento.

Aos meus pais, Josias e Daniela, por todos esses anos terem acreditado que eu podia fazer o que eu mais queria, me incentivando e apoiando nas melhores e piores horas.

Ao Ronnie Cesar, que por 19 anos me valoriza, me incentiva e acredita que eu sempre posso mais, te amo.

Ao meu irmão Thiago Daniel e minha cunhada Renata, que mesmo longe me ajudam e apoiam sempre.

Aos meu padrinhos Vanderléia e Luis Cesar (e a Beatriz), com quem eu cresci vendo o que era a vida acadêmica e sempre evoluindo pra aprender mais.

Ao meu orientador, professor Italmara Teodorico Navarro, por todos esses anos de aprendizado, puxões de orelha e conselhos pra toda a vida, muito obrigada.

A Prof^a. Regina Mitsuka Breganó, por me acolher lá na época da especialização e fazer parte de toda a minha caminhada acadêmica até o Doutorado, muito obrigada.

A Dr. Jaqueline Dario Capobianco, por ser mais que uma amiga, a quem fui apresentada as pressas mas fui admirando a cada ano que passava.

A Prof^a. Edna Maria Vissoci Reiche, por aceitar fazer parte da banca e por sempre emprestar o transferidor de nitrocelulose de seu laboratório quando o nosso não funcionava, obrigada.

Ao Prof. Marcell Alysson Batisti Lozovoy por ter aceito fazer parte da banca, obrigada.

Aos amigos do laboratório de Protozoologia/Zoonoses/Parasitologia do Hospital Vetrinário da Universidade Estadual de Londrina: Andressa Matos, Ana Flávia Minutti, Aldair Matos, Beatriz de Souza Lima Nino, Aline Ticiani Paschoal, Ana Clécia, Eloisa Cardart, Felipe Martins, Fernanda Ferreira, Hugo Luca, João Pedro Sasse, Juliana Bernardes, Juliana Oliveira, Marcelle Mareze, Mércia Seixas, Nelson Jessé, Priscila Carneiro e Ricardo Matos, por muitos momentos de distração, aprendizado, lanches e café bem sevido.

As amigas Ana Sue, Thaís Agostinho e Magda Bispo (e a Guta, Sassá e Pícrico), por dois anos e meio de convivência e muita história pra contar no nosso Lindas do 102.

Aos amigos do Studio Sarah Lima e Cia Carolina Carvalho de Dança do Ventre que faziam minhas tardes semanais mais leves, dançando e vivendo a maravilha do ballet clássico e da dança do ventre. Obrigada Sarah Lima, Giovana Matos, Eduarda Hirle, Maria Eduarda, Ana Beatriz, Beatriz, Waldir e Cleide Marinho e minhas turminhas de ballet (baby e 1º ano). A Carolina Carvalho e Lia Lemos e toda minha turma do avançado da dança do ventre.

Ao pessoal do Centro de Controle de Infecções Hospitalares do Hospital Universitário, pela companhia e apoio durante as pesquisas e análises dos prontuários.

A Helenice Kieski, secretária do Proograma de Pós Graduação em Ciência Animal e Valdecir Gomes, secretário do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela ajuda e conversas de corredor.

As mães e crianças atendidas no Hospital Universitário que colaboraram com o projeto.

E a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“A felicidade pode ser encontrada mesmo nos mais escuros dos tempos, se alguém lembrar
de acender a luz.”*

(Albus Dumbledore em “Harry Potter e o Prisioneiro de Azkaban”, J.K. Rowling)

MONICA, Thaís Cabral. **Aplicabilidade do método de *Western Blot* para diagnóstico da toxoplasmose congênita.** 2019. 65 folhas. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A infecção por *Toxoplasma gondii* em mulheres grávidas pode levar à toxoplasmose congênita. Quanto mais cedo o diagnóstico da infecção durante a gestação e precoce o tratamento, menores as manifestações da infecção na criança e a doença não é aparente ao nascimento. Em 2006, implantou-se o Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita na atenção primária de Londrina, com a investigação sorológica, diagnóstico e tratamento para toxoplasmose durante o atendimento pré-natal, foi iniciada a notificação da toxoplasmose na gestação e da toxoplasmose congênita, mediante a utilização de uma ficha específica, aplicada, inicialmente, pelas unidades sentinelas, e posteriormente, pelos diversos serviços de saúde, contribuindo para a coleta de dados, produção de informações epidemiológicas regionais e ampliação do conhecimento sobre a doença no país. Porém um dos problemas observados foi a dificuldade em fechar o diagnóstico da toxoplasmose congênita (TC), o método de *Western Blot* (WB) é uma ferramenta para identificação do diagnóstico de TC dessa criança, auxiliando no tratamento precoce. Com essa necessidade o objetivo deste trabalho é apresentar o uso do *Western Blot* (WB) como método para diagnóstico precoce das crianças atendidas na rotina ambulatorial. No período de junho de 2014 a junho de 2018, 92 crianças foram acompanhadas no ambulatório de Moléstias Infecciosas. Para a confirmação da toxoplasmose congênita a criança tinha que apresentar IgM reagente ou lesão ocular característica da toxoplasmose (coriorretinite/lesão macular) ou lesão do SNC (calcificações, microcefalia, hidrocefalia) ou IgG anti – *T. gondii* reagente por quimiluminescência após 12 meses de vida ou WB positivo. O exame de *Western Blot* foi utilizado como metodologia de auxílio no diagnóstico precoce da doença e considerado positivo quando a criança apresentava bandas diferentes ou de maior intensidade em relação as bandas maternas. Entre as crianças atendidas, em 25/92 (27,1%) foi confirmado o diagnóstico, 4% (1/25) apresentou lesão ocular (turvação vítrea), 12% (3/25) alguma alteração do SNC (calcificações, hidrocefalia, microcefalia) e 20% (5/25) apresentaram lesões associadas de SNC e ocular, os títulos de IgM foram reagentes em apenas 05/33 (20%) crianças e 14 (56%) apresentaram IgG reagente após 12 meses. Em 18/25 (72%) foram encontradas alterações no WB e entre elas, 8 (32%) o diagnóstico foi feito com a ajuda do WB, pois elas não apresentavam IgG/IgM anti-*T.gondii* reagente e eram assintomáticas. Em relação ao início do tratamento das mães, 5/21 (23,8 %) foram no 1º trimestre, 7/21 (33,3%) no 2º trimestre e 9/21 (42,8%) no 3º trimestre e em 21/25 (84%) crianças infectadas a mãe foi tratada. A variação do peso molecular de proteínas reconhecidos pelo soro da criança apresentado foi de 250kD a 10kD. A mais presente foi a de 90kD (26,3%), seguida por 149kD (22,2%) e 28kD (19,2%). A precocidade no diagnóstico da infecção permite o tratamento adequado do bebê sendo capaz de reduzir sequelas da toxoplasmose futuramente nessa criança. O diagnóstico pelo exame de *Western Blot* foi conclusivo e pode ser incluído na rotina do diagnóstico da toxoplasmose congênita, na caracterização precoce dessa infecção e é fator determinante para tratamento das crianças acometidas.

Palavras – chave: *Toxoplasma gondii*, Recém-Nascido, *Western Blot*, Sorologia, Gestantes.

MONICA, Thaís Cabral. **Applicability of the *Western Blot* method for diagnosis of congenital toxoplasmosis.** 2019. 65 sheets. Thesis (Doctorate in Animal Science) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii infection in pregnant women may lead to congenital toxoplasmosis. The earlier the diagnosis of infection during pregnancy and the early treatment, the lower the manifestations of infection in the child and the disease is not apparent at birth. In 2006, the Gestational and Congenital Toxoplasmosis Health Surveillance Program was implemented in Londrina primary care, with serological investigation, diagnosis and treatment for toxoplasmosis during prenatal care. congenital toxoplasmosis, through the use of a specific form, initially applied by the sentinel units, and later by the various health services, contributing to data collection, production of regional epidemiological information and expansion of knowledge about the disease in the country. However, one of the problems observed was the difficulty in closing the diagnosis of congenital toxoplasmosis (CT), the Western Blot (WB) method is a tool to identify the diagnosis of CT of this child, helping in the early treatment. With this need the objective of this paper is to present the use of Western Blot (WB) as a method for early diagnosis of children treated in the outpatient routine. From June 2014 to June 2018, 92 children were followed at the Infectious Diseases outpatient clinic. To confirm congenital toxoplasmosis, the child had to have IgM reagent or ocular lesion characteristic of toxoplasmosis (chorioretinitis / macular lesion) or CNS lesion (calcifications, microcephaly, hydrocephalus) or anti - *T. gondii* chemiluminescence - reagent IgG after 12 months. life or positive WB. The Western Blot test was used as an aid methodology in the early diagnosis of the disease and was considered positive when the child had different or more intense bands in relation to the maternal bands. Among the children treated, in 25/92 (27.1%) the diagnosis was confirmed, 4% (1/25) had ocular injury (vitreous turbidity), 12% (3/25) some CNS alteration (calcifications, hydrocephalus). , microcephaly) and 20% (5/25) had associated CNS and ocular lesions, IgM titers were reactive in only 05/33 (20%) children and 14 (56%) had reactive IgG after 12 months. In 18/25 (72%) changes in WB were found and among them, 8 (32%) were diagnosed with the help of WB, as they had no reagent IgG / IgM and were asymptomatic. Regarding the beginning of treatment of mothers, 5/21 (23.8%) were in the 1st trimester, 7/21 (33.3%) in the 2nd trimester and 9/21 (42.8%) in the 3rd trimester and in 21/25 (84%) infected children the mother was treated. The molecular weight range of proteins recognized by the presented child serum was 250kD to 10kD. The most present was 90kD (26.3%), followed by 149kD (22.2%) and 28kD (19.2%). The early diagnosis of infection allows the proper treatment of the baby being able to reduce sequelae of toxoplasmosis in this child in the future. The diagnosis by Western Blot examination was conclusive and should be included in the routine diagnosis of congenital toxoplasmosis, in the early characterization of this infection and is a determining factor for the treatment of affected children.

Key words: *Toxoplasma gondii*, Newborn, *Western Blot*, Serology, Pregnant women.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenhos esquemáticos de um taquizoíta (esquerda) e bradizoíta (direita) de <i>T. gondii</i> . Os desenhos são compostos de micrografias eletrônicas (adaptado de DUBEY et al., 1998).....	4
Figura 2 – Ciclo de Transmissão do <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Figura 3 – <i>Western Blot</i> do binômio Mãe/Filho demonstrando as bandas encontradas, a banda em vermelho (142) é a mais na criança podendo ser indicativo de toxoplasmose congênita.....	11
Figura 4 – Exemplo de diferentes padrões de proteínas reconhecidas por anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> nas amostras do binômio mãe/criança pelo método de <i>Western Blotting</i> . Setas pretas identificam bandas com intensidade maior na criança (C) do que na mãe (M), setas vermelhas identificam bandas diferentes entre os mesmos.....	25
Figura 5 – Exemplo de diferentes padrões de proteínas reconhecidas por anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> nas amostras do binômio mãe/criança pelo método de <i>Western Blotting</i> . Setas pretas identificam bandas com intensidade maior na criança (C) do que na mãe (M), setas vermelhas identificam bandas diferentes entre os mesmos.....	40
Figura 6 – Distribuição das proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i> mais reconhecidas, segundo o peso molecular, nas crianças com toxoplasmose congênita atendidas no Hospital Universitário de Londrina – PR.....	42
Figura 7 – Exemplo de bandas relativas as proteínas mais reconhecidas nas crianças com toxoplasmose congênita obtidas pelo exame de <i>Western Blotting</i> . (A) Bandas reconhecidas em soro de criança. PC: Controle Positivo; NC: Controle negativo.....	42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Característica dos casos de Toxoplasmose congênita atendidos no Hospital Universitário de Londrina – PR de 2014 a 2018, quanto ao tratamento da mãe e da criança, resultados de sorologia (IgG e IgM) e resultado do Western Blot.....27
- Tabela 2** – Características dos casos de Toxoplasmose Congênicas de mães que perderam seguimento no Hospital Universitário de Londrina – PR, nos anos de 2014 a 2018.....32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD	Bandas Diferentes
BI	Bandas Iguais
BMI	Bandas Mais Intensas
CMV	Citomegalovírus
DAB	Diaminobenzidina (3,3' - (C ₆ H ₃ (NH ₂) ₂) ₂)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRAs	Grânulos densos (organelas secretórias do <i>Toxoplasma gondii</i>)
HU	Hospital Universitário
IFI	Imunoflorescência Indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Quilodalton
MICs	Micronemas (organelas secretórias do <i>Toxoplasma gondii</i>)
NR	Não Reagente
PCR	Reação em Cadeia Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PS	Perda de Seguimento
QL	Quimiluminescência
RONs	Roptrias de pescoço (<i>neck of the rhoptries</i>)
ROPs	Roptrias (organelas secretórias do <i>Toxoplasma gondii</i>)
SAGs	Antígeno solúvel da superfície parasitária
SDS-Page	Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Toxoplasmose Congênita
WB	<i>Western Blot</i>
µl	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	HISTÓRICO.....	15
2.2	O AGENTE	15
2.2.1	Ciclo Biológico.....	16
2.2.2	Estruturas Básicas.....	17
2.2.3	Cepas e Patogenia.....	18
2.2.4	Fontes de Infecção e Soroprevalência em Gestantes.....	19
2.3	DISGNÓSTICO	20
2.3.1	Diagnóstico Materno	21
2.3.2	Diagnóstico na Criança.....	22
2.4	<i>WESTERN BLOT</i>	23
2.5	TRATAMENTO.....	25
2.5.1	Gestante.....	25
2.5.2	Criança.....	25
3	JUSTIFICATIVA	26
	REFERÊNCIAS	27
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	32
5	ARTIGO A – <i>WESTERN BLOT</i>: FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	33
6	ARTIGO B – PERFIL DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS PELO MÉTODO DE <i>WESTERN BLOT</i> EM CRIANÇAS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.	43

7	CONCLUSÃO.....	55
	ANEXOS	56
	ANEXO A – Parecer do comitê de Ética	57

1 1 INTRODUÇÃO

2
3 A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular
4 obrigatório, de distribuição mundial e que acomete animais de sangue quente, inclusive o ser
5 humano. O efeito do *T. gondii* na saúde pública e na produção animal é significativamente
6 evidente em todo o mundo. Embora a taxa de prevalência da toxoplasmose seja, de
7 aproximadamente, um terço da população humana mundial, a infecção por *T. gondii* em
8 indivíduos imunocompetentes é geralmente assintomática; porém, alguns pacientes podem
9 apresentar febre e outros sinais clínicos não específicos (MOHAMED & HAJISSA, 2017;
10 HILL & DUBEY, 2002).

11 O parasita pode ser adquirido por três vias principais: ingestão de oocistos esporulados
12 presentes no meio ambiente, ingestão de cistos teciduais em carne crua ou malcozida de animais
13 infectados e pela via transplacentária. Segundo Cook et al. (2000), o fator de risco mais
14 preditivo de infecção aguda em mulheres grávidas foi a ingestão de carne de cordeiro, bovina
15 ou de caça malcozida e o contato direto com o solo, Lopes et al. (2009), também encontraram
16 risco associado ao solo quando demonstraram que o consumo de hortaliças era o fator de risco
17 mais importante em gestantes. A variação da prevalência parece ser devida a fatores climáticos,
18 geográficos, hábitos alimentares, tipo de trabalho e hábitos culturais, indicando que os
19 mecanismos de transmissão devem ocorrer de várias formas e podem explicar a variabilidade
20 desta infecção em diferentes áreas geográficas de um determinado país (HILL & DUBEY,
21 2002; ELSHEIKHA, 2008).

22 A transmissão congênita do *T. gondii* pode ocorrer durante a primoinfecção de gestantes
23 quando o parasita pode ser transmitido ao feto através da placenta (TENTER et al., 2000). A
24 transmissão transplacentária por taquizoítas tem sido responsabilizada pela ocorrência de
25 abortos, natimortos, lesões oculares, debilidade, déficit auditivo e mortalidade neonatal
26 (CARELLOS et al., 2008).

27 Wong & Remington (1994) detectaram que o risco de transmissão congênita aumenta
28 progressivamente com a idade gestacional de soroconversão materna, observaram que a
29 incidência de infecção fetal, na ausência de tratamento, foi de aproximadamente 10% a 15%
30 durante o primeiro trimestre da gestação, de 30% no segundo trimestre e de 60% no terceiro
31 trimestre.

32 Nas gestantes, o diagnóstico precoce da infecção pelo *T. gondii* e o tratamento
33 antiparasitário adequado podem reduzir a gravidade das sequelas ao feto (REMINGTON et al,
34 2006; NAVARRO et al, 2018). O diagnóstico da toxoplasmose adquirida na gestação se baseia

1 em exames laboratoriais pois, geralmente, a gestante não apresenta sintomas da infecção;
2 entretanto, os exames sorológicos são complexos e é necessário o conhecimento das limitações
3 de cada método, a avaliação do perfil das classes de imunoglobulinas presentes e a sua
4 associação com a idade gestacional (JONES et al., 2003). Sem a interpretação correta dos
5 resultados, muitas gestantes são tratadas desnecessariamente e outras, por falha ou ausência de
6 diagnóstico, não são tratadas. Ambas as situações podem ser danosas tanto para mãe quanto
7 para o feto (REMINGTON et al., 2006).

8 O diagnóstico preciso da infecção adquirida por métodos rápidos e específicos é crucial
9 para o manejo adequado da toxoplasmose e, juntamente com a educação em saúde, representa
10 o passo-chave na prevenção e no tratamento da doença (HILL & DUBEY, 2002).

11 O objetivo deste trabalho foi avaliar o exame de *Western Blot* (WB) como metodologia
12 confirmatória para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

14 **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

16 2.1 HISTÓRICO

18 O protozoário *T. gondii* foi primeiramente descrito por Splendore (1909) que o isolou
19 de um pequeno coelho de laboratório e o denominou *Toxoplasma cuniculli*. Ao mesmo tempo,
20 Nicolle & Manceaux (1909), encontraram um parasita no baço, fígado e sangue de um pequeno
21 roedor conhecido por gondi (*Ctenodactylus gundi*), na Tunísia, África do Sul, e o denominaram
22 como *Leishmania gondii*. Porém, somente no ano seguinte, baseando-se nas características
23 morfológicas, adequaram a nomenclatura para *Toxoplasma gondii*, parasita pertencente ao filo
24 Apicomplexa, que tem seu gênero derivado do grego *toxon* (arco) e *plasma* (molde), devido a
25 seu formato em lua crescente (NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

27 2.2 O AGENTE

29 Pertencente ao Filo Apicomplexa, Ordem Eucoccidiida e Família Sarcocystidae, tendo
30 os felídeos, principalmente os gatos, como os hospedeiros definitivos, pois são os únicos a
31 terem a fase sexuada que eliminarem oocistos do parasita nas fezes, e os hospedeiros
32 intermediários são todos os animais de sangue quente, incluindo o ser humano (FRENKEL,
33 1970).

1 2.2.1 Ciclo Biológico

2

3 *T. gondii* apresenta-se em três formas infectantes: taquizoítos (em grupos ou clones),
4 bradizoítos (em cistos de tecido) e esporozoítos (em oocistos). Estas fases estão ligadas a um
5 ciclo de vida complexo (DUBEY et al., 1998).

6 Os taquizoítos (do grego *takhos* = rápido) representam o estágio em que ocorre a
7 multiplicação rápida em qualquer célula do hospedeiro. Tem formato de arco ou meia-lua
8 medindo 6 μm de comprimento e 2 μm de largura, são responsáveis pelas manifestações clínicas
9 e reações inflamatórias que resultam da fase aguda da infecção. Entram na célula do hospedeiro
10 ativamente através da membrana plasmática ou por fagocitose (DUBEY, 2009). São
11 disseminados pelo sistema linfático e sanguíneo infectando vários tecidos, incluindo sistema
12 nervoso central (SNC), olhos, musculatura esquelética, cardíaca e placenta (DUBEY et al.,
13 1998; TENTER et al., 2000). Taquizoítos de última geração iniciam a segunda fase do
14 desenvolvimento que, sob o estímulo da resposta imune do hospedeiro, diferenciam-se em
15 bradizoítos algumas semanas após a infecção (DUBEY, 2009).

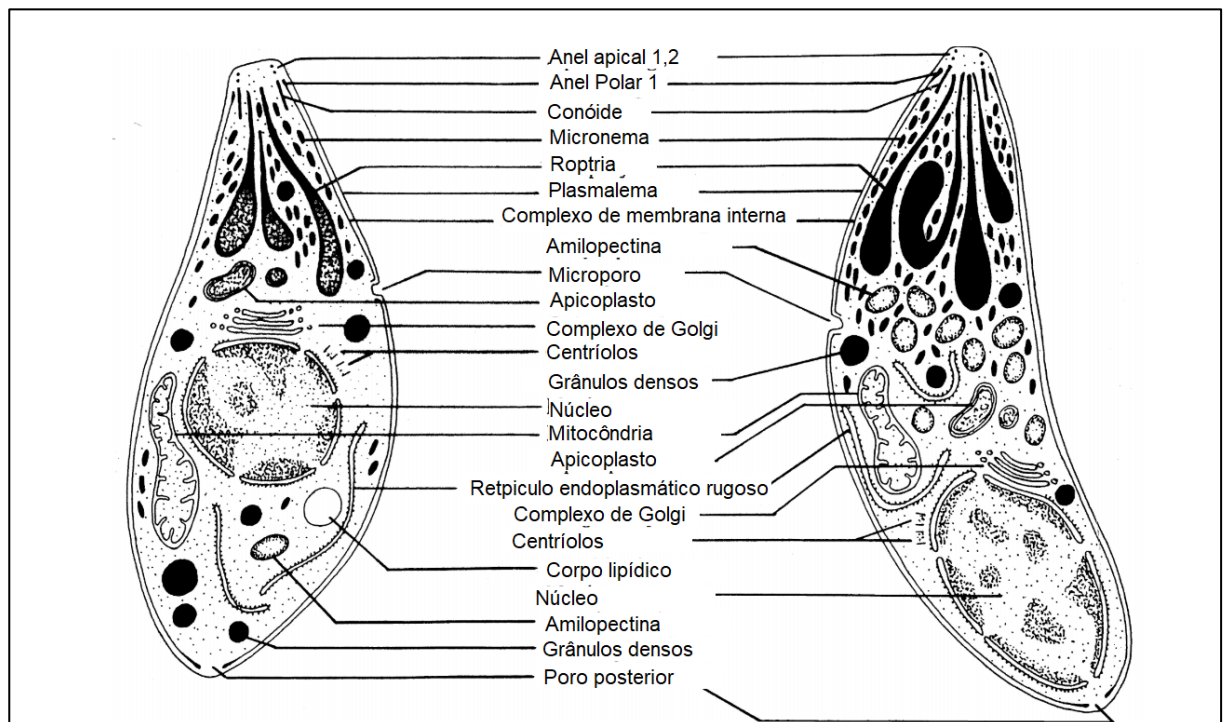
16 Os bradizoítos são organismos de proliferação lenta (do grego *brady* = lento), estão
17 presentes no interior de cistos teciduais e são morfologicamente semelhantes aos taquizoítos.
18 Esses cistos teciduais tem uma elevada afinidade por tecidos neurais e musculares, incluindo o
19 cérebro, olhos, músculos cardíacos e esqueléticos, variando de tamanho; cisto jovens podem
20 ser pequenos com 5 μm de diâmetro e conter apenas dois bradizoítos, enquanto os mais velhos
21 podem conter centenas desses organismos (DUBEY et al., 1998). É o estágio do ciclo de vida
22 terminal no hospedeiro intermediário, podendo persistir à vida toda. Esse mecanismo ainda é
23 desconhecido; no entanto, muitos pesquisadores acreditam que cistos teciduais se rompem
24 periodicamente transformando-se em taquizoítos que invadem novamente células hospedeiras
25 e voltam a ser bradizoítos dentro de novos cistos teciduais; se ingeridos por um hospedeiro
26 definitivo, os bradizoítos iniciam outra fase de proliferação assexuada. Quando ingerido pelos
27 felinos (hospedeiros definitivos), além da fase assexuada, ocorre também a fase sexual do ciclo
28 de vida do parasita (FRENKEL, 1970; DUBEY et al., 1998; TENTER et al., 2000; HILL &
29 DUBEY, 2002).

30 Os oocistos são resistentes às condições ambientais e resultam da fase sexuada do ciclo.
31 São eliminados por um curto período de tempo (1-2 semanas), em número tão expressivo que
32 asseguram a contaminação generalizada do meio ambiente. No meio ambiente dentro de 1 a 5
33 dias após a excreção e, dependendo do clima e condições ambientais, ocorre a esporulação. Os
34 oocistos, quando maduros, possuem dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada e são

1 as formas infectantes para qualquer vertebrado homeotérmico. Podem sobreviver em solo
 2 úmido durante meses ou anos, o que facilita sua dispersão (FRENKEL, 1970; DUBEY et al.,
 3 1998; HILL; DUBEY, 2002).

4 2.2.2 Estruturas Básicas

7 Os estágios invasivos do *T. gondii* são caracterizados pela presença de um complexo
 8 apical composto por organelas especializadas e secretoras. São três tipos: micronemas, roptrias
 9 e grânulos densos, e carregam suas proteínas características MICs, RONs, ROPs e GRAs,
 10 respectivamente. Micronemas estão envolvidas na fixação e penetração do *T. gondii*, enquanto
 11 roptrias são necessárias para criar uma estrutura transitória de junção em movimento e, em
 12 seguida, o estabelecimento do vacúolo parasitóforo, grânulos densos secretam proteínas durante
 13 a maioria dos estágios do parasita, exemplificado na Figura 1 (TOMAVO, 1996;
 14 DLUGONSKA, 2008). O processo de secreção coincide com a formação da rede intravacuolar
 15 e continua durante a residência intracelular de *T. gondii* (CARRUTHERS et al., 1999).



18 Figura 1. Desenhos esquemáticos de um taquizoíta (esquerda) e bradizoíta (direita) de *T.*
 19 *gondii*. Os desenhos são compostos de micrografias eletrônicas (adaptado de DUBEY et al.,
 20 1998).

1 A superfície celular externa do taquizoíto é recoberta por proteínas, com peso molecular
2 variando entre 22 a 43 kDa, todas ancoradas na membrana a partir de pontes de
3 glicosilfosfatidilinositol (GPI), conhecidas como SAGs (TOMAVO, 1996). A p30 (SAG1),
4 proteína de superfície mais abundante, representa até 5% do total de proteínas do taquizoíto e
5 é um importante componente da rede vesicular dentro do vacúolo parasitóforo, reconhecidas
6 por anticorpos no soro humano e, por ser muito imunogênica, induz a produção de anticorpos
7 IgG, IgM e IgA. É utilizada no diagnóstico da infecção aguda em adultos ou na forma congênita
8 (KASPER et al 1993).

9 Potasman et al (1986) demonstraram que o soro de pessoas não infectadas reage com a
10 banda 30 kDa em *imunoblots*, sugerindo a presença de anticorpos naturais ou de reação cruzada,
11 e a intensidade desta banda aumenta após infecção com o *T.gondii*.

12 13 2.2.3 Cepas e Patogenia

14
15 Devido a importância da toxoplasmose na saúde pública, muitos estudos buscam
16 comparar geneticamente isolados para assim compreender melhor a transmissão desse parasita
17 (DUBEY, 2009). Quando se tratava de variabilidade genética da população de *T. gondii*,
18 inicialmente, era classificada como de baixa variabilidade, com uma estrutura altamente clonal
19 com três linhagens genéticas, tipo I, II e III, sendo isolados de humanos e animais na Europa e
20 América do Norte (HOWE, SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al, 2002). No entanto, estudos
21 mais recentes na América do Sul documentaram a descoberta de cepas geneticamente atípicas
22 (não clonais) de *T. gondii* isoladas de pacientes humanos, que causaram sintomas clínicos muito
23 mais exacerbados em comparação com suas contrapartes europeias Assim, o número de cepas,
24 ou isolados, que não podem ser categorizados como linhagens clonais dos tipos I, II e III
25 aumentou fortemente e, superou em número aqueles que são convencionalmente categorizados
26 (SHWAB et al., 2014; MONTAZERI et al., 2018).

27 Pena et al. (2007) analisaram amostras de DNA de 46 isolados de *T. gondii* de gatos em
28 11 municípios do estado de São Paulo e foram caracterizadas geneticamente usando marcadores
29 de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de PCR. Um marcador adicional,
30 CS3, que se localiza no cromossomo VIIa e anteriormente demonstrou estar ligado à virulência
31 aguda de *T. gondii* também foi usado para determinar associação à virulência em camundongos.
32 A genotipagem desses 46 isolados revelaram uma alta diversidade genética com 20 genótipos,
33 mas nenhuma linhagem clonal de Tipo I, II ou III foi encontrada. Quatro dos 48 genótipos com
34 múltiplos isolados identificados em diferentes hospedeiros e locais foram considerados as

1 linhagens clonais comuns no Brasil. Essas linhagens são designadas como tipos BrI, BrII, BrIII
2 e BrIV. Esses resultados indicaram que a população de *T. gondii* no Brasil é altamente
3 diversificada, com algumas linhagens clonais bem-sucedidas expandidas em amplas áreas
4 geográficas. A análise das taxas de mortalidade em camundongos infectados indicou que o Tipo
5 BrI era altamente virulento, o Tipo BrIII não era virulento, enquanto as linhagens Tipo BrII e
6 BrIV eram intermediárias. Além disso, os tipos de alelos no locus CS3 estavam fortemente
7 ligados à virulência do parasita no camundongo.

8 Segundo Gilbert et al. (2009), existem evidências de que o curso clínico da
9 toxoplasmose congênita difere em países da Europa e EUA, quando comparado com regiões da
10 América do Sul: a doença ocular é cinco vezes mais comum em crianças com toxoplasmose
11 congênita, identificadas pela triagem neonatal no Brasil do que em crianças identificadas por
12 triagem pré-natal ou neonatal na Europa. É provável que a maior frequência e gravidade da
13 toxoplasmose congênita no Brasil estejam associadas ao predomínio de cepas recombinantes
14 observadas em nosso país.

15

16 2.2.4 Fontes de Infecção e Soroprevalência em Gestantes

17

18 A infecção por *T. gondii* ocorre por três vias principais demonstrados na Figura 1. A
19 fecal-oral ocorre com a ingestão de oocistos eliminados pelas fezes dos felídeos, em água, solo,
20 areia, frutas e verduras contaminados; o carnivorismo, pelo consumo de carnes e embutidos
21 frescos crus ou malcozidos contendo cistos teciduais e a via transplacentária, com a passagem
22 de taquizoítos presentes na circulação materna durante a fase aguda da infecção (MITSUKA-
23 BREGANÓ et al., 2010). Além da infecção usual pela ingestão de cistos teciduais ou por
24 oocistos esporulados, outras vias de transmissão foram relatadas como transplante de órgãos,
25 transfusão sanguínea e acidentes de laboratório (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

26

27

28



1
2 Figura 2. Ciclo de transmissão do *Toxoplasma gondii* (MITSUKA-BREGANÓ; LOPES-
3 MORI; NAVARRO, 2010).

4
5 Estudos realizados no Brasil mostraram que 60 a 75% das mulheres em idade
6 reprodutiva apresentam anticorpos da classe IgG contra *T. gondii*, isto é, 25% a 40% delas são
7 suscetíveis a essa infecção. A prática de seleção sorológica rotineira, adotada na França e na
8 Áustria, obrigatória por lei, teve como consequência redução acentuada na incidência de
9 toxoplasmose congênita nesses países (MUSSI-PINHATA & YAMAMOTO, 1999; REICHE
10 et al., 2000). Um estudo realizado por Lopes et al. (2009), em gestantes atendidas na rede
11 pública de saúde do município de Londrina, Paraná, revelou uma soropositividade de anticorpos
12 IgG anti-*T.gondii* de 49,2% em 492 gestantes. Os fatores associados à infecção foram a baixa
13 renda per capita, o baixo grau de escolaridade, a presença de gato na residência e o hábito de
14 ingerir verduras e legumes crus. Não houve associação com a ingestão de carne crua ou
15 malpassada e o contato com solo.

16 17 2.3 DIAGNÓSTICO

18
19 O diagnóstico da toxoplasmose adquirida se baseia em exames laboratoriais, pois
20 geralmente, o indivíduo não apresenta sintomas da infecção (SENSINI, 2006). Porém, a
21 sorologia é complexa e de difícil interpretação, sendo necessário o conhecimento das limitações
22 de cada metodologia e avaliação do perfil das classes de imunoglobulinas presentes na amostra
23 biológica a fim de determinar quando a infecção ocorreu (MITSUKA-BREGANO et al., 2010).

1 Entre as dificuldades que existem na interpretação dos resultados nos testes sorológicos
2 para a toxoplasmose ressalta-se a possibilidade da persistência de IgM anti- *T. gondii* reagente
3 após até três anos de infecção, ou sua presença inespecífica ou taxas de soroconversão muito
4 baixas, até mesmo a presença de IgM e resposta retardada de IgG. Mesmo com essas
5 dificuldades, o diagnóstico laboratorial é essencial, pois podem ocorrer resultados discordantes
6 e somente são definidos por meio de repetição com amostras seriadas após algumas semanas
7 ou com o emprego de outros testes para pesquisa de anticorpos (BRESSIÈRES et al, 2006).

8 9 2.3.1 Diagnóstico Materno

10
11 No Brasil, a grande dificuldade de utilizar o teste de avidéz de IgG como exame
12 confirmatório é que muitas gestantes iniciam o pré-natal tardiamente, após 16 semanas de idade
13 gestacional, nestes casos, IgG de forte avidéz, não excluí a infecção no início da gestação.
14 Assim sendo, estas gestantes devem ser tratadas e os seus bebês acompanhados até que a
15 infecção congênita seja descartada (LIESENFELD et al., 2001; LOPES-MORI et al, 2011;
16 CAPOBIANGO et al, 2014).

17 Outro fator importante do diagnóstico sorológico para a toxoplasmose na gestante é a
18 metodologia empregada para a pesquisa de anticorpos, especialmente da IgM, onde nos testes
19 convencionais de imunofluorescência indireta (IFI) ou teste imunoenzimático (ELISA) ocorre
20 uma competição, com os anticorpos IgG, pelos sítios de ligação do antígeno fixado na lâmina
21 ou na microplaca, respectivamente, resultando em reações falso-negativas (MITSUKA-
22 BREGANÓ et al, 2010). Também podem ocorrer resultados falso-positivos pela presença de
23 anticorpos autoimunes como o antinuclear ou fator reumatóide. A utilização de métodos que
24 usam o princípio de captura de IgM minimizam esses resultados indesejados (REMINGTON
25 et al., 2006).

26 Outro método de diagnóstico é a reação em cadeia de polimerase (PCR). Romand et al.
27 (2004) analisaram a positividade na PCR como marcador de prognóstico precoce da infecção
28 fetal. Estes autores correlacionaram a maior quantidade de parasitas no líquido amniótico,
29 utilizando a técnica de PCR em tempo real, com o aumento do risco de desenvolver infecção
30 grave.

31 Muitos problemas podem ser atribuídos à técnica de PCR dentre eles, uma provável
32 causa de resultados falso-negativos que ocorre devido a transmissão mais tardia do parasita ao
33 feto, posterior à realização do PCR, ou devido ao tratamento da mãe que também reduz essa
34 passagem do parasita (ROBERT-GANGNEUX et al, 2017). Em alguns países, como no Brasil,

1 o acompanhamento sorológico em gestantes, quando realizado, é trimestral; assim, o
2 diagnóstico de soroconversão materna pode ser muito tardio e, no momento da amniocentese,
3 o parasita não seria mais encontrado. Outro fator que pode interferir na sensibilidade da técnica
4 de PCR é a diferença nos genótipos das cepas de *T.gondii* encontradas em cada região
5 (GROVER et al., 1990).

6

7 2.3.2. Diagnóstico na Criança

8

9 A infecção fetal tem consequências imprevisíveis, mas as sequelas podem ser
10 prevenidas ou reduzidas pelo tratamento precoce. Os testes convencionais para o
11 estabelecimento do diagnóstico fetal da toxoplasmose incluem a identificação direta do parasita
12 ou a inoculação de líquido amniótico e/ou sangue do cordão umbilical em camundongos
13 (PINON et al., 2001; MITSUKA-BREGANÓ et al., 2010).

14 De acordo com Pinon et al. (2001), o diagnóstico pós-natal da toxoplasmose congênita
15 é feito em dois casos: quando os sinais clínicos ocorrem nos primeiros seis meses de vida da
16 criança e não está disponível informações sobre o estado sorológico pré-natal da mãe e quando
17 é diagnosticada a soroconversão durante a gravidez. Meios parasitológicos e imunológicos de
18 diagnóstico de toxoplasmose congênita são usados durante o primeiro ano de vida; no entanto,
19 existem dois grandes obstáculos para o diagnóstico pós-natal como a baixa sensibilidade da
20 detecção do parasita e a alta concentração de anticorpos IgG maternos que atravessam a barreira
21 transplacentária e atingem a circulação dos recém-nascidos, o que dificulta e retarda os meios
22 imunológicos de diagnóstico. Nestes casos, deve-se continuar o monitoramento sorológico por
23 até um ano de vida (REMINGTON et al., 2006; MITSUKA-BREGANÓ et al., 2010).

24 Além das dificuldades encontradas para a definição do diagnóstico da infecção na
25 gestante e no feto, a maioria das crianças infectadas não apresenta IgM anti-*T.gondii* reagente
26 e a evolução da resposta humoral na toxoplasmose juntamente com a parasitemia fugaz
27 dificultam a distinção entre infecção e não infecção, tornando o diagnóstico precoce do binômio
28 mãe/bebê um desafio (CAMPOS et al., 2017).

29 Abordagens baseadas na comparação de perfil imunológico da mãe e da criança, como
30 o *imunoblotting*, distinguem a expressão de anticorpos materna da fetal, e exibem novos
31 anticorpos neonatais sintetizados (PINON et al., 2001).

32 Lago et al. (2004) realizaram um estudo em que investigaram a taxa de positividade para
33 IgM anti-*T. gondii* em recém-nascidos com toxoplasmose congênita, e a idade de negatificação
34 desses anticorpos. Concluíram que, mesmo testado por métodos sorológicos de grande

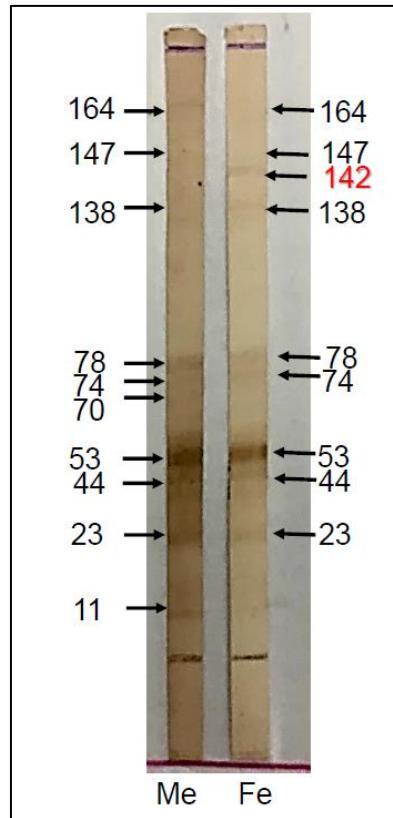
1 sensibilidade, até um terço dos bebês com TC poderia ser negativo para Toxo-IgM ao
2 nascimento e que na maioria dos recém-nascidos ou lactentes positivos, esse período é bastante
3 fugaz. Chegaram à conclusão de que crianças infectadas que apresentaram Toxo-IgM positiva
4 na triagem neonatal podem se apresentar negativas por ocasião dos testes confirmatórios, o que
5 não pode ser considerado como falsa positividade do teste de triagem, salientam a importância
6 de não interrupção do monitoramento com suspeita da TC por apresentarem Toxo-IgM
7 negativo.

8

9 2.4 – *WESTERN BLOT*

10

11 Vários autores apontam o método de *Western Blot* como ferramenta complementar útil
12 para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita (RORMAN et al, 2006; ROBERT-
13 GANGNEUX et al,1999; CAPOBIANGO et al, 2016; GONZALEZ-ACHAR et al, 2018).
14 Remington et al. (1985), introduziram o WB para comparar anticorpos neonatos *versus* os
15 maternos, e durante as tentativas de desenvolver novos métodos para o diagnóstico da infecção
16 no feto e recém-nascido, demonstraram a utilidade do exame de WB para essa finalidade. Ainda
17 relataram que as bandas eram claramente diferentes em IgG - WB e/ou IgM - WB de soros de
18 lactentes infectados que não estavam presentes em amostras de soro de suas mães (Figura 3)
19 (REMINGTON et al, 2004).



1
2 Figura 3. *Western Blot* do binômio Mãe/Filho demonstrando as bandas encontradas, a
3 banda em vermelho (142) é a mais na criança podendo ser indicativo de toxoplasmose
4 congênita.

5
6 Gross et al. (2000) realizaram um estudo em 97 crianças que nasceram de mães que
7 tiveram a soroconversão durante a gestação e compararam o perfil de IgG entre mãe e filho
8 pelo WB. A sensibilidade obtida pelo exame foi de 82,4% e a especificidade 93,0%. Os autores
9 relataram ainda que a interpretação de resultados se mostrou simples, com total concordância
10 entre examinadores diferentes. Pinon et al. (2001), trabalhando com IgM-WB, encontraram
11 uma sensibilidade de 68% e especificidade de 98%. Quando o método foi associado com
12 métodos sorológicos habituais, a sensibilidade foi maior que 90%, sendo possível evidenciar
13 reações para antígenos específicos de *T. gondii*, por vezes insuficientes para originar um sinal
14 detectável em testes como ELISA.

15 Machado et al. (2010) relataram que a associação IgM-WB em crianças com lesões
16 maculares foi estatisticamente significativa em comparação com as crianças que não
17 apresentaram lesões e que essas crianças tiveram um risco 1,2 vezes maior de apresentar lesões
18 maculares do que as crianças que apresentaram resultados negativos do exame. Vários estudos
19 relatam que a associação de outros métodos, indiretos ou diretos, com o WB elevam a

1 sensibilidade e especificidade do diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita
2 (CHUMPITAZI et al., 1995; RILLING et al., 2003; MACHADO et al., 2010; MAGI et al.,
3 2011).

4 5 2.5 – TRATAMENTO

6 7 2.5.1 - Gestante

8 O tratamento para TC é baseado nas drogas espiramicina, que é indicada no primeiro
9 trimestre da gestação em gestantes com infecção aguda, pois não atravessa a barreira placentária
10 não oferecendo risco iatrogênico para o feto. E quando a infecção fetal for confirmada ou for
11 adquirida na fase mais tardia da gestação (quando a taxa de transmissão materno-fetal é maior)
12 é utilizado o esquema tríplice que é a combinação de sulfadiazina, pirimetamina associada ao
13 ácido folínico, indicada em gestantes com mais de 18 semanas de gestação, por causa dos
14 efeitos teratogênicos da pirimetamina que deve ser evitada nos primeiros 3 meses (FRENKEL,
15 2002; MITSUKA-BREGANÓ et al., 2010).

16 Amendoeira & Camillo-Couro (2010) indicam que nos casos em que a infecção fetal
17 não for confirmada, o tratamento com espiramicina poderá ser continuado durante toda a
18 gestação. Embora o benefício do tratamento na gestação ainda seja controverso, tem sido
19 demonstrado efeitos na redução da transmissão transplacentária do parasito e também na
20 diminuição da gravidade das manifestações clínicas nos neo- natos (REMINGTON et al.,
21 2006).

22 23 2.5.2 – Criança

24 O tratamento da criança com toxoplasmose congênita, suspeita ou confirmada, deve ser
25 realizado desde o nascimento, utilizando-se o esquema tríplice. Nos casos confirmados de
26 toxoplasmose congênita o tratamento deve se estender até um ano de idade, porém o tratamento
27 precoce pode interferir na síntese de anticorpos específicos, retardando o aparecimento de IgG
28 de alta avidéz (REMINGTON et al., 2006; MITSUKA-BREGANÓ et al., 2010).

29 A associação do tratamento e acompanhamento clínico e sorológico da criança é de
30 fundamental importância devido à alta dificuldade de interpretação dos resultados de exames
31 da TC.

32
33
34

1 3 JUSTIFICATIVA

2

3 Devido à necessidade de avaliar outros métodos para o diagnóstico rápido de
4 toxoplasmose congênita que podem diferir dos diagnósticos sorológicos convencionais,
5 juntamente com a dificuldade de interpretar esses resultados e a importância de identificar
6 antígenos de *Toxoplasma gondii* que são mais frequentemente reconhecidos por nossa
7 população de crianças infectadas, o objetivo deste trabalho é demonstrar a aplicabilidade do
8 método *Western Blot* no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 **REFERÊNCIAS**

- 2 AMENDOEIRA, M.; CAMILLO-COURA, L. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na
3 gestação A brief review on toxoplasmosis in pregnancy. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 113–
4 119, 2010.
- 5
6 BESSIÈRES, M.-H.; CHEMLA, C.; CIMON, B.; MARTY, P.; GAY-ANDRIEU, F.;
7 PELLOUX, H.; RABODONIRINA, M. Les difficultés d'interprétation de la sérologie de la
8 toxoplasmose. **Parasitologie, Revue Francophone des Laboratoires**, juin, 2006.
- 9
10 CAMPOS, F. A.; ANDRADE, G. M. Q.; TIBÚRCIO, J. D.; et al. Treat or not to treat infant
11 with possible congenital toxoplasmosis? Diagnostic classification system could aid decision.
12 **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 27, n. Supl 3, p. 16–24, 2017. Disponível em:
13 <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2238-3182.20170025>>.
- 14
15 CAPOBIANGO, J. D.; MITSUKA BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T.; et al. Congenital
16 toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Journal of**
17 **Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 364–371, 2014. Elsevier Editora Ltda. Disponível em:
18 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84904069606&doi=10.1016%2Fj.bjid.2013.11.009&partnerID=40&md5=14b229c4d9c2e66c42e86c2aca619e98)
19 [84904069606&doi=10.1016%2Fj.bjid.2013.11.009&partnerID=40&md5=14b229c4d9c2e66c](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84904069606&doi=10.1016%2Fj.bjid.2013.11.009&partnerID=40&md5=14b229c4d9c2e66c42e86c2aca619e98)
20 [42e86c2aca619e98](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84904069606&doi=10.1016%2Fj.bjid.2013.11.009&partnerID=40&md5=14b229c4d9c2e66c42e86c2aca619e98)>.
- 21
22 CAPOBIANGO, J. D.; MONICA, T. C.; FERREIRA, F. P.; et al. Evaluation of the *Western*
23 *Blotting* method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n.
24 6, p. 616–623, 2016. Elsevier Editora Ltda. Disponível em:
25 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84995514047&doi=10.1016%2Fj.jped.2016.02.014&partnerID=40&md5=60153ca1cbfa11910bca7c05a66cc105)
26 [84995514047&doi=10.1016%2Fj.jped.2016.02.014&partnerID=40&md5=60153ca1cbfa1191](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84995514047&doi=10.1016%2Fj.jped.2016.02.014&partnerID=40&md5=60153ca1cbfa11910bca7c05a66cc105)
27 [0bca7c05a66cc105](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84995514047&doi=10.1016%2Fj.jped.2016.02.014&partnerID=40&md5=60153ca1cbfa11910bca7c05a66cc105)>.
- 28
29 CARELLOS, E. V. M.; ANDRADE, G. M. Q. DE; AGUIAR, R. A. L. P. DE. Avaliação da
30 aplicação do protocolo de triagem pré-natal para toxoplasmose em Belo Horizonte, Minas
31 Gerais, Brasil: estudo transversal em puérperas de duas maternidades. **Cadernos de Saúde**
32 **Pública**, v. 24, n. 2, p. 391–401, 2008.
- 33
34 CARRUTHERS, V. B.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. Secretion of micronemal proteins
35 is associated with toxoplasma invasion of host cells. **Cellular Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 225–
36 235, 1999.
- 37
38 CHUMPITAZI, B. F. F.; BOUSSAID, A.; PELLOUX, H.; et al. Diagnosis of congenital
39 toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. **Journal of Clinical**
40 **Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1479–1485, 1995. Disponível em:
41 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7650171>>. .
- 42
43 COOK, A. J. C.; GILBERT, R. E., BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.;
44 JENUM, P. A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A. E.; DUNN, D. T.; HOLLIMAN, R. Sources of
45 Toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. **British**
46 **Medical Journal**, v. 321, p. 142-147, 2000.
- 47
48 DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; PINEDA, N.; KYVSGAARD, N. C.; LUNA, L. A.;

- 1 RIMBAUD, E.; OLIVEIRA, J. B.; KWOK, O. C. H.; QI, Y.; SU, C. Biologic and genetic
2 characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, **Central**
3 **America. Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 47-53, 2006.
- 4
- 5 DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites,
6 Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical**
7 **Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.
- 8
- 9 DUBEY, J.P., Toxoplasmosis—a waterborn zoonosis. Review. **Veterinary Parasitology**, v.
10 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.
- 11
- 12 DUBEY, J.P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2º ed. **CRC Press**; 2009, 313 páginas.
- 13 DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E.; PECKHAN, C.; GILBERT, R.
14 Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counseling. **Lancet**,
15 v. 353, p. 1829-1833, 1999.
- 16
- 17 DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: What’s out and where did
18 they come from. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. March, p. 190–195, 2009.
- 19
- 20 DLUGONSKA, H. *Toxoplasma* Rhoptries: Unique Secretory Organelles and Source of
21 Promising Vaccine Proteins for Immunoprevention of Toxoplasmosis . **Journal of**
22 **Biomedicine and Biotechnology**, v. 2008, p. 1–7, 2008.
- 23
- 24 ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action.
25 **Journal of the Royal Institute of Public Health**, v. 122, p. 335-338, 2008.
- 26
- 27 FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage
28 identified as coccidia oocysts. **Science**, v. 167, p. 893-896, 1970.
- 29
- 30 FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis. In: VERONESI, R. Focaccia eds. Tratado de Infectologia, São
31 Paulo: Guanabara Koogan, p. 1310-1324. 2002.
- 32
- 33 GILBERT, R. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works. **Mem Inst**
34 **Oswaldo Cruz**, Vol. 104: 305-311, 2009.
- 35
- 36 GONZÁLEZ-ACHAR, I.; GONZÁLEZ-VATTEONE, C.; ARÉVALO-DE GUILLÉN, I.; et
37 al. Perfil antigénico en fase aguda y crónica de toxoplasmosis en embarazadas por la técnica de
38 *Western Blot*. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 16, n.
39 3, p. 35–43, 2018. Disponível em:
40 <[http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282018000300035&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
41 [95282018000300035&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282018000300035&lng=es&nrm=iso&tlng=es)>.
- 42
- 43 GROSS U, LÜDER CGK, HENDGEN V, HEEG C, SAUER I, WEIDNER A, et al.
44 Comparative Immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC test) for
45 early diagnosis of congenital toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**. v. 38: p. 3619-3622, 2000.
- 46
- 47 GROVER, C. M.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J. S.; BOOTHROYD, J. C. Rapid prenatal
48 diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic
49 fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 2297-2301, 1990.
- 50

- 1 HILL, D. AND DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin.**
2 **Microbiol. Infect.** 8, 634–640, 2002.
- 3
- 4 JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital Toxoplasmosis. **American Family**
5 **Physician**, v. 67, p. 2131-2138, 2003.
- 6
- 7 KASPER, L. H.; KHAN, I. A.; ELY, K. H.; MINEO, J. R. Role of P30 in Attachment and
8 Immunity to *T. Gondii*. In: J. E. Smith (Org.); **Toxoplasmosis**. p.126–130, 1993. Springer-
9 Verlag Berlin Heidelberg.
- 10
- 11 LIESENFELD, O.; MONTOYA, J. G.; TATHINENI, N. J.; DAVIS, M.; BROWN, B. W. JR.
12 ; COBB, K. L. ; PARSONNET, J.; REMINGTON, J. S. Confirmatory serologic testing for
13 acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive
14 *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. **American Journal of Obstetrics and**
15 **Gynecology**, v. 184, p. 140-145, 2001.
- 16
- 17 LOPES, F. M. R.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; GONÇALVES, D. D.; FREIRE, R. L.;
18 KARIGYO, C. J. T.; WEDY, G. F.; MATSUO, T.; REICHE, E. M. V.; MORIMOTO, H. K.;
19 CAPOBIANGO, J. D.; INOUE, I. T.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Factors associated
20 with seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina,
21 Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 378-382, 2009.
- 22
- 23 LOPES-MORI, F. M. R.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; CAPOBIANGO, J. D.; et al. Programas
24 de controle da toxoplasmose congênita. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 5,
25 p. 594–599, 2011. Disponível em:
26 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0104423011703943>>.
- 27
- 28 MACHADO, A. S.; ANDRADE, G. M. Q.; JANUÁRIO, J. N.; et al. IgG and IgM *Western*
29 *Blot* assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**,
30 v. 105, n. 6, p. 757–761, 2010. Fundacao Oswaldo Cruz. Disponível em:
31 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77958011938&doi=10.1590%2FS0074-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77958011938&doi=10.1590%2FS0074-02762010000600005&partnerID=40&md5=fdae4c0360f644a5c1a28d48f2257356)
32 [02762010000600005&partnerID=40&md5=fdae4c0360f644a5c1a28d48f2257356](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77958011938&doi=10.1590%2FS0074-02762010000600005&partnerID=40&md5=fdae4c0360f644a5c1a28d48f2257356)>.
- 33
- 34
- 35 MAGI, B.; MIGLIORINI, L. *Western Blotting* for the diagnosis of congenital toxoplasmosis.
36 **The new microbiologica**, v. 34, n. 1, p. 93–5, 2011. Italy. Disponível em:
37 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21344152>>.
- 38
- 39 MITSUKA-BREGANÓ; LOPES, F.M.R.; NAVARRO, I.T. “Toxoplasmose Gestacional e
40 Congênita: Manual de Vigilância em Saúde, Diagnóstico, Tratamento e Condutas”. **Editora**
41 **EDUEL**, 2010.
- 42
- 43 MITSUKA-BREGANÓ, Regina. Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose
44 Gestacional e Congênita: elaboração, implantação e avaliação no município de Londrina,
45 Paraná. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2009.
- 46
- 47 MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976,
48 2004.
- 49

1 MONTAZERI, M.; MEHRZADI, S.; SHARIF, M.; et al. Drug Resistance in *Toxoplasma*
2 *gondii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, 2018. Disponível em:
3 <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02587/full>>.

4
5 MOHAMED, Z.; HAJISSA, K. Effective Diagnostic Marker for Serodiagnosis of *Toxoplasma*
6 *gondii* Infection: New Developments and Perspectives. **Toxoplasmosis**, 2017. InTech.
7 Disponível em: <[https://www.intechopen.com/books/toxoplasmosis/effective-diagnostic-](https://www.intechopen.com/books/toxoplasmosis/effective-diagnostic-marker-for-serodiagnosis-of-toxoplasma-gondii-infection-new-developments-and-pe)
8 [marker-for-serodiagnosis-of-toxoplasma-gondii-infection-new-developments-and-pe](https://www.intechopen.com/books/toxoplasmosis/effective-diagnostic-marker-for-serodiagnosis-of-toxoplasma-gondii-infection-new-developments-and-pe)>. .

9
10 MUSSI - PINHATA, M.; YAMAMOTO, A. Y. Infecções congênitas e perinatais. **Jornal de**
11 **Pediatria**, v. 75, n. 1, p. S15–S30, 1999.

12
13 NAVARRO, I. T., MITSUKA–BREGANÓ, R., HEADLEY, S. A., CAPOBIANGO, J. D.,
14 INOUE, I. T., CASELLA, A. M., ... & MORI, F. M. L. **Human Congenital Toxoplasmosis.**
15 *Congenital Toxoplasmosis in Humans and Domestic Animals*, 13, 2018.

16
17 NICOLLE. C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du *gondii*. **Comptes Rendus de**
18 **L'Academie dès Science**, v. 147, p. 763-766, 1909.

19
20 PINON J.M.; DUMOND H.; CHENLA C. et al. Strategy for diagnosis of congenital
21 toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods
22 for postnatal detection of immunoglobulin G, M and A antibodies. **Journal of Clinical**
23 **Microbiology**, v.39, p.2267-2271, 2001.

24
25 POTASMAN, I.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. *Toxoplasma* antigens recognized by
26 naturally occurring human antibodies. **Journal of clinical microbiology**, v. 24, n. 6, p. 1050–
27 4, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3536997>>. .

28
29 REICHE, E. M. V. et al. Prevalence of american trypanosomiasis, syphilis, toxoplasmosis,
30 rubella, hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency virus infection, assayed through
31 serological tests among pregnant patients, from 1996 to 1998, of the Hospital Universitário
32 Regional Norte do Paraná (Londrina State University, Paraná, Brazil). **Revista da Sociedade**
33 **Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 6, p. 519-527, 2000.

34
35 REMINGTON, J.S.; ARAUJO, F.G.; DESMONTS, G. Recognition of different *Toxoplasma*
36 antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns.
37 **Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 5, p. 1020-1024, 1985.

38
39 REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTROYA, J. G. Recent Developments for Diagnosis
40 of Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 941–945, 2004.

41
42 REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In:
43 Remington & Klein, Wilson & Baker. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 6^a
44 ed. Ed. **Elsevier Saunders**, Philadelphia - USA; chap. 31, p. 947-1091, 2006.

45
46 RILLING, V.; DIETZ, K.; KRCZAL, D.; KNOTEK, F.; ENDERS, G. Evaluation of a
47 commercial IgG/IgM *Western Blot* assay for early postnatal diagnosis of congenital
48 toxoplasmosis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official**
49 **publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 22, p. 174–180, 2003.

- 1 ROBERT-GANGNEUX, F.; COMMERCE, V.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-
2 CAMET, J. Performance of a *Western Blot* assay to compare mother and newborn anti-
3 Toxoplasma antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **European**
4 **journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European**
5 **Society of Clinical Microbiology**, v. 18, n. 9, p. 648–54, 1999. Disponível em:
6 <<http://link.springer.com/10.1007/s100960050366>>. .
7
- 8 ROBERT-GANGNEUX, F.; BRENIER-PINCHART, M. P.; YERA, H.; et al. Evaluation of
9 Toxoplasma ELITE MGB real-time PCR assay for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of**
10 **Clinical Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1369–1376, 2017.
11
- 12 ROMAND, S.; CHOSSON, M.; FRANCK, J.; WALLON, M.; KIEFFER, F.; KAISER, K.;
13 DUMON, H.; PEYRON, F.; THULLIEZ, P.; PICOT, S. Usefulness of quantitative polymerase
14 chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma*
15 *gondii*. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, p. 797-802, 2004.
16
- 17 RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis-
18 prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 458–
19 472, 2006.
20
- 21 SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of
22 serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 6, p. 504-512, 2006.
23
- 24 SPLENDORE A. Sur un nouveau protozoaire parasite du lapin: deuxième note préliminaire.
25 **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v.2, p.462-465, 1909.
26
- 27 SHWAB, E. K.; ZHU, X. Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J.
28 P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by
29 multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453-461, 2014.
30
- 31 TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to
32 humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217–1258, 2000.
33
- 34 TISSOT DUPONT D.; FRICKER-HIDALGO H., BRENIER-PINCHART M.P. et al.
35 Usefulness of Western Blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital
36 toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. V.22,
37 p.122-125, 2003.
38
- 39 TOMAVO, S. The major surface proteins of *Toxoplasma gondii*: structures and functions. In:
40 **Toxoplasma gondii**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1996. p. 45-54.
41
- 42 WONG, S.Y.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical infectious**
43 **diseases**, p. 853-861, 1994.
44
45
46
47
48

4 OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

Caracterizar clínica e laboratorialmente a toxoplasmose congênita e avaliar a técnica de *Western Blot* para o diagnóstico precoce da doença.

4.2 - Objetivos específicos

- Propiciar um método laboratorial que auxilie o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.
- Acompanhar do perfil de anticorpos IgG anti *Toxoplasma gondii* pelo método *Western Blott* na criança desde 1^a semana de vida até a alta ambulatorial, para observação de proteínas novas ou permanentes.
- Verificar a idade esperada para negatificação do *Western Blott* em crianças não infectadas em acompanhamento.
- Identificar proteínas específicas no *Western Blott* nas crianças com toxoplasmose congênita.

1 **ARTIGO A**

2

3 *Western Blot: ferramenta no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita*4 *Western Blot: a tool for an early diagnosis of congenital toxoplasmosis*5 Thaís Cabral Monica^{1*}, Jaqueline Dario Capobianco², Ricardo Luís Nascimento de
6 Matos¹, Edna Maria Visocci Reiche³, Regina Mitsuka-Bregano¹, Itamar Teodorico Navarro¹.7 1 - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária
8 Preventiva, Londrina, PR, Brasil.9 2 – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Pediatria e Cirurgia
10 Pediátrica, Londrina, PR, Brasil.11 3 - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia, Londrina, PR,
12 Brasil.

13

14

RESUMO

15

16 A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita causada pelo protozoário *Toxoplasma*
17 *gondii* e a forma congênita da infecção pode se apresentar com sequelas graves ou tardias,
18 mesmo em crianças assintomáticas ao nascimento. O Objetivo do trabalho foi demonstrar a
19 utilização do Western Blot (WB) como ferramenta confirmatória para diagnóstico da
20 toxoplasmose congênita. No período de junho de 2014 a junho de 2018, 92 crianças foram
21 acompanhadas no ambulatório de Moléstias Infecciosas. Para a confirmação da toxoplasmose
22 congênita a criança tinha que apresentar IgM reagente por quimiluminescência (QL) ou lesão
23 ocular característica da toxoplasmose ou lesão do SNC (calcificações, microcefalia,
24 hidrocefalia) ou IgG anti – *T. gondii* reagente por QL após 12 meses de vida ou WB positivo.
25 O exame de Western Blot foi utilizado como metodologia de auxílio no diagnóstico precoce da
26 infecção e considerado positivo quando a criança apresentava bandas diferentes ou de maior
27 intensidade em relação as bandas maternas. Entre as crianças atendidas, em 25/92 (27,1%) foi
28 confirmado o diagnóstico, 4% (1/25) apresentou lesão ocular (turvação vítrea), 12% (3/25)
29 alguma alteração do SNC (calcificações, hidrocefalia, microcefalia) e 20% (5/25) apresentaram
30 lesões associadas de SNC e ocular, os títulos de IgM foram reagentes em apenas 05/33 (20%)
31 crianças e 14 (56%) apresentaram IgG reagente após 12 meses. Em 18/25 (72%) foram
32 encontradas alterações no WB e entre elas, 8 (32%) o diagnóstico foi feito com a ajuda do WB,
33 pois elas não apresentavam IgG/IgM anti-*T.gondii* reagente e eram assintomáticas. Em relação
34 ao início do tratamento das mães, 5/21 (23,8 %) foram no 1º trimestre, 7/21 (33,3%) no 2º
35 trimestre e 9/21 (42,8%) no 3º trimestre e em 21/25 (84%) crianças infectadas a mãe foi tratada.
36 O rápido diagnóstico da infecção permite o tratamento adequado do bebê, capaz de reduzir

1 sequelas da toxoplasmose na criança, portanto a associação do WB aos métodos convencionais
2 foi essencial para caracterização precoce da doença e possibilita o tratamento das crianças
3 acometidas.

4
5 Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, Gestantes, Recém-Nascido, Zoonose.

6
7 ABSTRACT

8
9 Toxoplasmosis is a cosmopolitan zoonosis caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*
10 and the congenital form of the infection may present with severe or late sequelae, even in
11 asymptomatic children at birth. The objective of this study was to demonstrate the use of
12 Western Blot (WB) as a confirmatory tool for the diagnosis of congenital toxoplasmosis (CT).
13 From June 2014 to June 2018, 92 children were followed at the Infectious Diseases outpatient
14 clinic. In order to confirm CT, the child had to have chemiluminescence - reagent IgM (CL) or
15 ocular lesion characteristic of toxoplasmosis or CNS injury (calcifications, microcephaly, and
16 hydrocephalus) or anti - *T. gondii* IgG reactive by CL after 12 months of life or positive WB.
17 The Western Blot test was used as an aid methodology in the early diagnosis of the infection
18 and was considered positive when the child presented different or more intense bands in relation
19 to the maternal bands. Among the children treated, in 25/92 (27.1%) the diagnosis was
20 confirmed, 4% (1/25) had ocular injury (vitreous turbidity), 12% (3/25) some CNS alteration
21 and 20% (5/25) had associated CNS and ocular lesions, IgM titers were reactive in only 05/33
22 (20%) children and 14 (56%) had reactive IgG after 12 months. In 18/25 (72%) changes in WB
23 were found and among them, 8 (32%) were diagnosed with the help of WB, as they had no
24 reagent IgG / IgM and were asymptomatic. Regarding the beginning of treatment of mothers,
25 5/21 (23.8%) were in the 1st trimester, 7/21 (33.3%) in the 2nd trimester and 9/21 (42.8%) in
26 the 3rd trimester and in 21/25 (84%) infected children the mother was treated. The rapid
27 diagnosis of infection allows the appropriate treatment of the baby, capable of reducing
28 sequelae of toxoplasmosis in children, so the association of WB with conventional methods
29 was essential for early characterization of the disease and enables the treatment of affected
30 children.

31
32 Key words: *Toxoplasma gondii*, Pregnant, Newborn, Zoonosis.

1 INTRODUÇÃO

2
3 A toxoplasmose é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* e pode ser transmitida
4 ao homem pela ingestão de carne crua ou malcozida, alimentos contaminados com oocistos e
5 transmissão congênita, que pode ocorrer durante a primoinfecção de gestantes quando o
6 parasito é transmitido ao feto através da placenta (TENTER et al., 2000).

7 A infecção aguda da gestante pode ser diagnosticada pela soroconversão dos anticorpos
8 IgM e IgG anti-*T. gondii*; ou sugerida pela presença de anticorpos IgM associados ou não aos
9 anticorpos IgG em títulos altos e em ascensão. A avidéz alta para anticorpos IgG auxilia na
10 exclusão de infecção nos últimos 3-4 meses. No entanto, a ausência de triagem sistemática, a
11 realização do primeiro exame após o primeiro trimestre de gestação e a falta de laboratórios de
12 referência no diagnóstico em toxoplasmose dificultam a interpretação dos exames (CAMPOS
13 et al., 2017).

14 A toxoplasmose congênita (TC) pode se apresentar com formas graves ao nascimento,
15 mas a maioria das crianças nasce assintomática e irá desenvolver sequelas tardias se não
16 diagnosticada e tratada precocemente. Nessas crianças, o diagnóstico confirmatório depende da
17 análise de vários parâmetros como presença de anticorpos IgM e/ou IgA anti-*T. gondii* e/ou
18 elevação do título de IgG e/ou persistência de IgG anti-*T.gondii* após 12 meses de idade com
19 ou sem sinais clínicos (AAP, 2018). Porém, os testes sorológicos apresentam sensibilidade
20 variável de 50 a 80%, dificultando o diagnóstico, além de baixa sensibilidade da IgM quando
21 detectada por métodos imunológicos indiretos, sendo necessário acompanhamento da criança
22 até um ano de idade para definir o diagnóstico (ROBERT-GANGNEUX et al., 1999; TISSOT-
23 DUPONT et al., 2003; CAPOBIANGO et al., 2016).

24 O diagnóstico laboratorial constitui um problema para os profissionais de saúde
25 envolvidos na assistência à gestante e a criança com suspeita de infecção pelo *T. gondii*. A
26 evolução da resposta humoral na toxoplasmose e a parasitemia fugaz dificultam a distinção
27 entre infecção aguda e crônica, tornando o diagnóstico precoce do binômio um desafio. Além
28 da complexidade de interpretação de marcadores de fase aguda, as modernas técnicas
29 laboratoriais nem sempre estão disponíveis nos serviços de saúde pública do país (CASTILHO-
30 PELOSO et al., 2005).

31 O método de *Western Blot* é considerado uma ferramenta complementar útil para o
32 diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, ele compara anticorpos neonatos *versus* os
33 maternos identificando os que são diferentes no soro da criança com suspeita de TC
34 (REMINGTON et al., 2006). Com sensibilidade de 82% e especificidade de 93%, o Western

1 Blot de IgG é de simples interpretação e um método complementar de auxílio na interpretação
2 dos exames da TC (GROSS et al., 2000).

3 Como muitas das crianças com TC não apresentam IgM anti-*T.gondii* reagente, a
4 confirmação do diagnóstico requer um seguimento prolongado, e a perda desse seguimento
5 prejudica o diagnóstico (CAPOBIANGO et al., 2016; MITSUKA-BREGANÓ et al., 2010).

6 O objetivo do trabalho foi demonstrar a utilização do *Western Blot* (WB) como
7 ferramenta confirmatória para o diagnóstico da TC.

8

9 **METODOLOGIA**

10

11 **Delineamento e população de estudo**

12

13 Foi realizado um estudo prospectivo de junho de 2014 a junho de 2018 em que, 92
14 crianças suspeitas de TC foram acompanhadas no ambulatório de Moléstias Infecciosas pelo
15 Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita, implantado no
16 Hospital Universitário (HU) de Londrina – PR, no ano de 2011. Este hospital é sentinela para
17 TC na Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. O estudo foi aprovado pelo
18 comitê de ética envolvendo seres humanos da UEL, sobre o CAAE: 91270818.3.0000.5231.

19 Foram acompanhadas crianças cujas mães eram consideradas suspeitas para
20 toxoplasmose, pois apresentaram IgM reagente anti-*T.gondii* durante a gestação. Nenhuma das
21 crianças apresentaram imunodeficiência primária ou adquirida.

22 Realizou-se pesquisa por quimioluminescência (QL) de IgM e IgG (seguimento
23 mensal), fundoscopia (exame de fundo de olho), exames de imagens (ultrassonografia
24 transfontanelar e/ou tomográfica computadorizada de crânio) e outros exames complementares.

25 Dados referentes ao acompanhamento da criança e da mãe foram coletados no sistema
26 integrado do HU (Sistema: Laudhos e Labhos) e dos prontuários médicos.

27

28 **Confirmação congênita**

29 Para a confirmação da toxoplasmose congênita a criança tinha que apresentar IgM anti-
30 *T. gondii* reagente e/ou lesão ocular característica da toxoplasmose e/ou lesão do SNC
31 (calcificações, microcefalia, hidrocefalia) e/ou IgG anti – *T. gondii* após 12 meses de vida por
32 quimioluminescência (QL) e/ou WB positivo (AAP, 2018; REMINGTON et al, 2011)

33

34

1 **Reações sorológicas para detecção de IgM e IgG:**

2 A triagem sorológica foi realizada por meio da pesquisa de anticorpos IgG e IgM anti-
3 *T. gondii* por QL (Architect® - System Abbott/Wiesbaden, Alemanha).

4

5 **Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blotting**

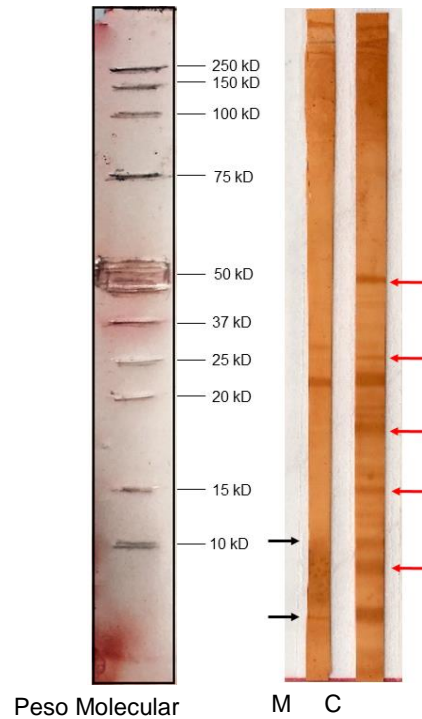
6 As proteínas de taquizoítos provenientes de cepa RH foram sonicadas a 23kHz, seis
7 vezes por 30 minutos a 4°C e posteriormente quantificadas por Kit Micro BCA™ Protein Assay
8 (Thermo Scientific™. Waltham, Massachusetts, EUA). Foram separadas por eletroforese de
9 SDS-PAGE vertical em gel a 12% e 5% (TOWBIN, 1979). As amostras aplicadas foram
10 diluídas em tampão de amostra e como curva de referência foi utilizado o marcador Unstained
11 Protein Standards™ (Precision Plus Protein™, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Califórnia,
12 EUA). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas por eletroforese para
13 membrana de nitrocelulose (iBlot Transfer Stacks Nitrocellulose, Regular size, Invitrogen™.
14 Carlsbad, Califórnia, EUA) em sistema de transferência semi-seco (iBlot Gel Transfer System,
15 Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Após a
16 transferência, a membrana foi bloqueada em solução de bloqueio (7Mm Na₂HPO₄, 3Mm
17 NaH₂PO₄, 140mM NaCl com 1% de caseína) por 3 horas ou overnight a temperatura ambiente,
18 lavadas três vezes com tampão de lavagem. As tiras de nitrocelulose foram incubadas com
19 amostras de soro (das gestantes e das crianças), diluídas a 1:50 em tampão de lavagem (7Mm
20 Na₂HPO₄, 3Mm NaH₂PO₄, 140mM NaCl com 1% caseína) por 1h30min. Após três lavagens
21 com tampão de lavagem, as tiras foram incubadas a temperatura ambiente por 1h30min, com
22 anticorpos anti-IgG humanos marcados com peroxidase, diluídos 1:2000 em tampão de
23 lavagem (Bethyl Lab, Montgomery, TX, USA). A atividade da peroxidase foi revelada pela
24 adição de solução de substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂. Quando as bandas
25 eram observadas, a reação era interrompida com água destilada. Soros controles positivo e
26 negativo para o *T. gondii* foram incluídos em cada teste. Este protocolo foi modificado a partir
27 do citado por Capobiango, et al. 2016. A leitura do WB foi realizada por duas pessoas com
28 100,0% de concordância.

29

30 **Exame de Western Blotting**

31 O exame foi realizado comparando-se o perfil de proteínas reconhecidas pelo soro da
32 mãe e da criança do nascimento até o terceiro mês de vida, e posteriormente as proteínas
33 reconhecidas pela criança até os 18 meses de vida. Para o WB ser considerado positivo a criança
34 teria que apresentar uma ou mais bandas diferentes ou de maior intensidade em relação às

1 bandas maternas ou persistir com pelo menos uma banda reagente após os 12 meses de vida,
 2 para detecção de IgG anti-*T. gondii* (REMINGTON, et al. 2011; AAP, 2018) (Figura 1). Dados
 3 referentes ao acompanhamento da criança e da mãe foram coletados no sistema integrado do
 4 HU (Laudhos e Labhos) e dos prontuários médicos.
 5



8 Figura 4 – Exemplo de diferentes padrões de proteínas reconhecidas por anticorpos IgG anti-
 9 *T. gondii* nas amostras do binômio mãe/criança pelo método de *Western Blotting*. Setas pretas
 10 identificam bandas com intensidade maior na criança (C) do que na mãe (M), setas vermelhas
 11 identificam bandas diferentes entre os mesmos.
 12

13 **Análise estatística**

14 Todos os dados obtidos foram digitados em uma planilha do Programa EXCELL
 15 (Windows Microsoft) para posterior análise estatística. A frequência utilizada nas análises foi
 16 feita a partir do programa estatístico EPIINFO 3.5.1 (DEAN et al., 1996). O programa
 17 OriginPro8® foi utilizado para medição das bandas de WB.
 18

19 **RESULTADOS**

20
 21 Entre crianças atendidas no ambulatório de moléstias infecciosas do HU 92 foram
 22 acompanhadas, e 27,1% (25/92) foram confirmadas com TC. No exame de QL 56% (14/25)

1 apresentaram IgG reagente após 12 meses, 20% (5/25) com IgM reagente e em 72% (18/25)
2 apresentaram alguma alteração no WB, e em 32% (8/25) o diagnóstico foi feito a partir dos
3 resultados do exame de WB, pois as crianças não tinham IgG/IgM reagente e eram
4 assintomáticas.

5 Dos sintomas característicos da TC, 4% (1/25) apresentou lesão ocular (turvação vítrea),
6 12% (3/25) alguma alteração do SNC (calcificações, hidrocefalia, microcefalia) e 20% (5/25)
7 apresentaram lesões associadas de SNC e ocular. Em 84% (21/25) das crianças, as mães fizeram
8 o tratamento, tendo a maioria iniciado no 3º trimestre de gestação. Constatou-se a perda de
9 seguimento da criança em 32% (8/25), consistindo na maior parte crianças cujas mães eram
10 menores de idade. O WB teve 28% (7/25) de falso negativo, pois as crianças apresentaram IgG
11 reagente após 12 meses ou algum sintoma característico de TC e mantinham bandas idênticas
12 a da mãe e apresentou uma sensibilidade de 72% (18/25). Essas características são apresentadas
13 na Tabela 1.

1 Tabela 1 – Característica dos casos de Toxoplasmose congênita atendidos no Hospital Universitário de Londrina – PR de 2014 a 2018, quanto ao
 2 tratamento da mãe e da criança, resultados de sorologia (IgG e IgM) e resultado do Western Blot.

3

Casos	Idade da mãe (^a)	Tratamento Mãe	Início tratamento da mãe (trimestre)	Tratamento criança (tempo de tratamento)	IgM (^b)	IgG (^b) após 12 meses	WB	WB positivo após 12 meses (^c) – Número de bandas.	Sinais e sintomas
1	24	Não	0	Sim (4 meses)	NR	NR	BD	7 bandas	Assintomático
2	17	Não	0	Sim (1 ano)	Reagente	Reagente (↓)	BMI	4 bandas	Coriorretinite e calcificação cerebral
3	36	Não	0	Sim (1 ano)	NR	Reagente (↑)	BD	9 bandas	Coriorretinite e calcificação cerebral
4	22	Sim	1	Sim (1ano)	NR	Reagente (↓)	BD	2 bandas	Calcificação cerebral
5	33	Sim	1	Sim (3meses)	NR	NR	BD/BMI	11 bandas	Assintomático
6	20	Sim	1	Sim (1 ano)	NR	NR	BD	6 bandas	Turvação vítrea
7	34	Sim	1	Sim (4 meses)	NR	NR	BD	1 banda	Assintomático
8	17	Sim	1	Sim (1 ano)	NR	NR	BI	1 banda	Coriorretinite e calcificação cerebral
9	18	Sim	2	Sim (1 ano)	NR	Reagente (↓)	BI	1 banda	Assintomático
10	39	Sim	2	Sim (6 meses)	NR	NR	BMI	6 bandas	Assintomático

Casos	Idade da mãe (^a)	Tratamento Mãe	Início tratamento da mãe (trimestre)	Tratamento criança (tempo de tratamento)	IgM (^b)	IgG (^b) após 12 meses	WB	WB positivo após 12 meses (^c) – Número de bandas.	Sinais e sintomas
11	35	Sim	2	Sim (4 meses)	NR	NR	BD	1 banda	Assintomático
12	19	Sim	2	Sim (5 meses)	NR	NR	BMI	2 bandas	Assintomático
13	30	Sim	2	Sim (1 ano)	Reagente	Reagente (↓)	BI	7 bandas	Coriorretinite e calcificação cerebral
14	21	Sim	2	Sim (6 meses)	NR	Reagente (↓)	BMI	3 bandas	Assintomático
15	21	Sim	2	Sim (6 meses)	NR	Reagente (↓)	BMI	3 bandas	Assintomático
16	35	Sim	3	Sim (1 ano)	NR	Reagente (↑)	BMI	1 banda	Assintomático
17	33	Sim	3	Sim (1 ano)	Reagente	Reagente (↑)	BI	13 bandas	Coriorretinite e calcificação cerebral
18	25	Sim	3	Sim (2 meses)	NR	NR	BD	2 bandas	Assintomático
19	32	Sim	3	Sim (6 meses)	NR	NR	BMI	1 banda	Microcefalia
20	21	Sim	3	Sim (1 ano)	Reagente	Reagente (↓)	BD/BMI	7 bandas	Calcificação cerebral
21	28	Sim	3	Sim (1 ano)	Reagente	Reagente (↓)	BD	15 bandas	Assintomático
22	17	Não	3	Sim (9 meses)	NR	Reagente (↑)	BI	8 bandas	Assintomático
23	18	Sim	3	Sim (1 ano)	NR	Reagente (↑)	BI	5 bandas	Assintomático

Casos	Idade da mãe (a)	Tratamento Mãe	Início tratamento da mãe (trimestre)	Tratamento criança (tempo de tratamento)	IgM (b)	IgG (b) após 12 meses	WB	WB positivo após 12 meses (c) – Número de bandas.	Sinais e sintomas
24	20	Sim	3	Sim (7 meses)	NR	NR	BD/BMI	Em acompanhamento	Assintomático
25	26	Sim	3	Sim (4 meses)	NR	Reagente (↓)	BI	5 bandas	Assintomático

- 1
2 BI – Bandas iguais
3 BD – Bandas diferentes entre mãe e filho
4 BMI – Bandas de maior intensidade na criança.
5 (a) – Idade da mãe no nascimento da criança.
6 (b) – IgG e IgM por exame de quimioluminescência.
7 (c) – Persistência de bandas no exame de Western Blot após 12 meses.
8 WB – Western Blot binômio mãe/bebê.
9 NR – Não Reagente.
10 (↓) – Diminuição dos níveis IgG em relação a primeira coleta.
11 (↑) – Aumento dos níveis de IgG em relação a primeira coleta.
12 (↑) – Aumento dos níveis de IgG em relação a primeira coleta.
13

1 DISCUSSÃO

2
3 Muitas são as dificuldades de interpretação dos resultados nos testes sorológicos para
4 toxoplasmose, entre as doenças transmitidas congenitamente o diagnóstico da TC apresenta o
5 maior desafio devido à alta concentração de anticorpos IgG maternos que atravessam a barreira
6 transplacentária e atingem o sangue dos recém-nascidos. A presença de anticorpos IgM e/ou
7 IgA no sangue do recém-nascido revela infecção congênita, pois estas duas classes de
8 imunoglobulinas não atravessam a barreira transplacentária, embora a ausência de IgM e IgA
9 não exclua a infecção na criança. (REMINGTON et al., 2006).

10 A interpretação da sorologia é às vezes problemática, particularmente quando IgM não
11 é detectado, portanto os resultados da sorologia devem ser interpretados com cautela. O
12 conhecimento da cinética dos anticorpos durante a infecção e a prática de exames
13 complementares, como a utilização do Western Blot IgG e IgM, podem auxiliar na interpretação
14 dos resultados (SENSINI, 2006; CAPOBIANGO et al., 2016; CAMPOS et al., 2017). Estas
15 dificuldades para a interpretação dos testes sorológicos podem resultar no diagnóstico e
16 tratamento tardio da criança infectada e uso excessivo de medicação nas crianças não infectadas
17 (CAMPOS et al., 2017).

18 O WB tem sido utilizado como método auxiliar no diagnóstico da TC com a
19 comparação de padrões de proteínas reconhecidas pelos anticorpos de *T. gondii* e a
20 determinação da origem dos anticorpos, ou seja, transmitidos pela mãe ou sintetizados pelo feto
21 ou pela criança, permite o diagnóstico mais precoce e uma análise mais precisa (CHUMPITAZI
22 et al., 1995). Nosso trabalho demonstrou que o acompanhamento com essa técnica é essencial
23 para a confirmação do diagnóstico da TC, já que a maioria das crianças acompanhadas tiveram
24 alguma alteração no exame. Num primeiro momento o exame de WB apresenta mais
25 positividade e durante o seguimento dessa criança ele reduz a positividade. Obteve-se uma
26 porcentagem de 28% (7/25) de falsos negativos nos primeiros 3 meses de acompanhamento,
27 porém essas crianças tinham alguma alteração compatível com a TC e WB reagente após 12
28 meses, o que reforça a necessidade do acompanhamento dessa criança até um ano de idade.

29 Entre as 92 crianças atendidas, 25 (27,1%) foram confirmadas com TC, tendo o IgG-
30 WB como definidor de diagnóstico. Em um trabalho anterior, realizado por Capobiango et al.
31 (2016), em 47 crianças, 15 (15,1%) foram diagnosticadas com TC e em 32 (32,3%), este
32 diagnóstico foi excluído, demonstrando um aumento tanto na identificação da TC como da sua
33 exclusão nessa população. Já Boudaouara et al. (2018), na Tunísia avaliaram 35 casos de TC
34 por *immunoblot* e tiveram 23 (76%) casos confirmados pelo WB.

1 Entre os critérios diagnósticos de TC encontra-se a permanência do IgG após 12 meses,
2 neste trabalho, 14 (56%) crianças obtiveram esse padrão por QL, 8 (32%) somente tiveram a
3 confirmação da TC com o resultado do IgG-WB, pois não apresentaram IgG/IgM anti - *T.*
4 *gondii* reagente por QL e eram assintomáticas. O diagnóstico da infecção congênita baseia-se
5 na detecção de IgM e IgG específicos do toxoplasma, neste trabalho 5/25 (20%) crianças
6 apresentaram IgM reagente na primeira sorologia, esse número pode ser relacionado ao
7 tratamento precoce das mães, o que causaria bloqueio ou atraso da resposta imune. Além disso,
8 o atraso ou a ausência de resposta imune detectável por métodos padrões de sorologia pode
9 estar relacionado a diferenças nas respostas imune do indivíduo a diferentes proteínas do *T.*
10 *gondii* (SENSINI, 2006; CAPOBIANGO et al., 2016).

11 Em recém-nascidos sem IgM e / ou IgA, o diagnóstico de infecção congênita
12 geralmente é retardado até a observação de títulos persistentes de IgG anti-*T. gondii* além de 12
13 meses, ou aumento dos títulos de IgG. Outros autores relataram uma fraca sensibilidade da
14 detecção de IgM ao nascimento (RILLING et al., 1993), que é mais provável devido a uma
15 síntese transitória de IgM pelo feto e não a uma falha da técnica (ROBERT et al., 1999). Lago
16 et al. (2004) relatam que mesmo com métodos de alta sensibilidade, recém-nascidos com
17 toxoplasmose congênita podem ter anticorpos IgM negativos ao nascer e o período de
18 positividade pode ser bem curto sendo importante o monitoramento dessas crianças até um ano
19 de vida.

20 Sobre as sequelas da TC, nosso trabalho relatou que 4% (1/25) teve problema ocular,
21 12% (3/25) problemas relacionados a SNC e 20% (5/25) com problemas do SNC e ocular
22 associados. No decorrer dos anos houve uma diminuição da porcentagem das lesões do SNC,
23 oculares e de IgM reagente comparado com o estudo feito por Capobiango et al. (2016), na
24 mesma instituição, acompanhando 47 pares mãe/bebê, que demonstraram 53% de
25 Coriorretinite, 60% de calcificação cerebral e 40% com IgM reagente.

26 Em 84% (21/25) dos casos a mãe foi tratada, porém a maioria foi iniciado no 3º trimestre
27 de gestação e deve-se levar em conta que não se pode afirmar que a mãe foi infectada no 3º
28 trimestre ou se somente iniciou o tratamento nele, e quanto mais tardio o começo do tratamento
29 maior o risco de transmissão fetal e as sequelas apresentadas pelo bebê.

30 A perda de seguimento, no nosso trabalho, foi de 32% (8/25), sendo que a média de
31 idade das mães que não retornou ao ambulatório foi de 22,8 anos e uma delas era menor de
32 idade (Tabela 2), dado esse também encontrado por Machado et al. (2010), que tiveram uma
33 taxa de 12,5% (12/177) de perda de seguimento das crianças com TC.

34

1 Tabela 2 – Características dos casos de Toxoplasmose Congênitas de mães que perderam
2 seguimento no Hospital Universitário de Londrina – PR, nos anos de 2014 a 2018.

3

Casos	Idade da mãe (a)	Tratamento Mãe	Início tratamento da mãe (trimestre)	Tratamento criança (tempo de tratamento)	IgM^(b)	WB	Sinais e sintomas
1	20	Não	0	Sim (10 meses)	NR	BD	Assintomático
2	22	Sim	1	PS (1 mês)	NR	BD	Assintomático
3	27	Sim	1	PS (1 mês)	NR	BD	Assintomático
4	20	Sim	1	Sim (4 meses)	NR	BMI	Assintomático
5	29	Sim	2	PS (1 mês)	NR	BMI	Assintomático
6	24	Sim	2	Não (3 meses)	NR	BD	Assintomático
7	24	Sim	3	Sim (2 meses)	NR	BMI	Assintomático
8	17	Sim	3	Sim (8 meses)	NR	BD	Assintomático

4 BI – Bandas iguais

5 BD – Bandas diferentes entre mãe e filho

6 BMI – Bandas de maior intensidade na criança.

7 (a) – Idade da mãe no nascimento da criança.

8 (b) – IgG e IgM por exame de quimioluminescência.

9 WB – Western Blot binômio mãe/bebê.

10 NR – Não Reagente.

11

12 A instituição de um sistema de busca ativa, juntamente com a ampliação do
13 conhecimento sobre doença levando acesso a informação para população deve ser priorizada.
14 Desde que a TC se tornou notificação obrigatória, os serviços de saúde têm que acompanhar os
15 casos suspeitos até a definição diagnóstica. A partir da Portaria 204 do Ministério da Saúde do
16 Brasil no ano de 2016, estabeleceu-se uma rotina de notificação obrigatória da toxoplasmose
17 na gestação e da toxoplasmose congênita, mediante a utilização de ficha específica,
18 contribuindo para a coleta de dados, produção de informações epidemiológicas regionais e
19 ampliação do conhecimento sobre a doença no país (BRASIL, 2016; CAPOBIANGO et al.,
20 2016).

21

22 CONCLUSÃO

23

24 A técnica de Western Blot mostrou maior positividade para o diagnóstico da
25 toxoplasmose congênita nos primeiros meses de vida da criança e mostrou negatividade ao
26 longo do seguimento sugerindo a exclusão do diagnóstico da TC, houve uma diminuição dos

1 casos com sequelas da TC em relação a estudos anteriores devido ao tratamento mais frequente
2 das mães (84%). Em 32% (8/25) as crianças foram diagnosticadas com TC somente pelo WB,
3 por não apresentarem IgG/IgM anti-*T.gondii* reagente e serem assintomáticas.

4
5 **Suporte Financeiro:**

6 CAPES – Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior.

7
8 **Conflito de Interesses:**

9 Não há conflito de interesses associado a este trabalho.

10
11 **Agradecimentos:**

12 Aos funcionários do Hospital Universitário de Londrina, em especial ao departamento de CCIH
13 (Centro de Controle de Infecção Hospitalar).

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 **REFERÊNCIAS**

- 2 AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Report of Committee on Infectious Diseases.
3 *Toxoplasma gondii* infections (Toxoplasmosis). In: American Academy of Pediatrics. **Red**
4 **Book**. 31st. ed Illinois: Elk Grove Village; 2018, p. 809-820.
5
- 6 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a
7 Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos
8 serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá
9 outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2016.
10
- 11 BOUDAOUARA, Y.; AOUN, K.; MAATOUG, R.; et al. Congenital Toxoplasmosis in
12 Tunisia: Prenatal and Neonatal Diagnosis and Postnatal Follow-up of 35 Cases. **The American**
13 **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1722–1726, 2018. Disponível em:
14 <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.17-0580>>. .
15
- 16 CAMPOS, F. A.; ANDRADE, G. M. Q.; TIBÚRCIO, J. D.; et al. Treat or not to treat infant
17 with possible congenital toxoplasmosis? Diagnostic classification system could aid decision.
18 **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 27, n. Supl 3, p. 16–24, 2017. Disponível em:
19 <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2238-3182.20170025>>.
20
- 21 CAPOBIANGO, J. D.; MONICA, T. C.; FERREIRA, F. P.; et al. Evaluation of the Western
22 blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n.
23 6, p. 616–623, 2016. Elsevier Editora Ltda. Disponível em:
24 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84995514047&doi=10.1016%2Fj.jped.2016.02.014&partnerID=40&md5=60153ca1cbfa11910bca7c05a66cc105>>.
25
26
27
- 28 CASTILHO-PELLOSO, M. P.; MORAIS FALAVIGNA, D. L.; DE ARAÚJO, S. M.;
29 FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Monitoramento de gestantes com toxoplasmose em
30 serviços públicos de saúde. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.
31 6, p. 532–533, 2005.
32
- 33 CHUMPITAZI, B. F. F.; BOUSSAID, A.; PELLOUX, H.; et al. Diagnosis of congenital
34 toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. **Journal of Clinical**
35 **Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1479–1485, 1995. Disponível em:
36 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7650171>>.
37
- 38 DEAN, J. A.; COULOMBIER, D.; BURTON, A. H.; et al. Epi Info , Version 6: a word
39 processing, data bases, and statistic program for epidemiology on microcomputers. **CDC**, p.
40 599, 1996.
41
- 42 GONZÁLEZ-ACHAR, I.; GONZÁLEZ-VATTEONE, C.; ARÉVALO-DE GUILLÉN, I.; et
43 al. Perfil antigénico en fase aguda y crónica de toxoplasmosis en embarazadas por la técnica de
44 Western Blot. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 16, n.
45 3, p. 35–43, 2018. Disponível em:
46 <http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282018000300035&lng=es&nrm=iso&tlng=es>.
47
48
- 49 LAGO, E. G.; OLIVEIRA, A. P.; BENDER, A. L. Presence and duration of anti-Toxoplasma
50 gondii immunoglobulin M in infants with congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, v.

- 1 90, n. 4, p. 363–369, 2014. Elsevier Editora Ltda. Disponível em:
2 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
3 84903715800&doi=10.1016%2Fj.jped.2013.12.006&partnerID=40&md5=f4bc7824b50856ae
4 7e2de4bc5c9fe029](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84903715800&doi=10.1016%2Fj.jped.2013.12.006&partnerID=40&md5=f4bc7824b50856ae7e2de4bc5c9fe029)>. .
5
- 6 MACHADO, A. S.; ANDRADE, G. M.; JANUÁRIO, J. N.; et al. IgG and IgM western blot
7 assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.
8 105, n. 6, p. 757–761, 2010. Brazil: Fundacao Oswaldo Cruz. Disponível em:
9 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-
10 02762010000600005&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000600005&lang=pt)>.
11
- 12 MARCOLINO, P T; SILVA, D A; LESER, P G; CAMARGO, M E; MINEO, J R. Molecular
13 markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of
14 immunoglobulin G avidity by Western blotting. **Clinical and diagnostic laboratory
15 immunology**, v. 7, n. 3, p. 384–9, 2000.
16
- 17 MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F. M. R.; NAVARRO, I. T. **Toxoplasmose
18 Adquirida Na GestaçãO E Congênita**. Eduel, 2010.
19
- 20 POTASMAN, I.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Toxoplasma antigens recognized by
21 naturally occurring human antibodies. **Journal of clinical microbiology**, v. 24, n. 6, p. 1050–
22 4, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3536997>>. .
23
- 24 REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent Developments for Diagnosis
25 of Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 941–945, 2004.
26
- 27 RILLING, V.; DIETZ, K.; KRCZAL, D.; KNOTEK, F.; ENDERS, G. Evaluation of a
28 commercial IgG/IgM Western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital
29 toxoplasmosis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official
30 publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 22, p. 174–180, 2003.
31
- 32 ROBERT-GANGNEUX, F.; COMMERCE, V.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-
33 CAMET, J. Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-
34 Toxoplasma antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **European
35 journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European
36 Society of Clinical Microbiology**, v. 18, n. 9, p. 648–54, 1999. Disponível em:
37 <<http://link.springer.com/10.1007/s100960050366>>.
38
- 39 SENSINI, A. Toxoplasma gondii infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of
40 serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 6, p. 504–512, 2006.
41 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14628445>>.
42
- 43 TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. Toxoplasma gondii: From animals to
44 humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217–1258, 2000.
45
- 46 TISSOT DUPONT, D.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; et al.
47 Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital
48 toxoplasmosis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official
49 publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 122–5, 2003.
50 Disponível em:

1 <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12627289)
2 &list_uids=12627289>.

3
4 TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from
5 polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of**
6 **the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4,
7 1979. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bies.950190612>>. .

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

ARTIGO B

Perfil de proteínas do *T.gondii* identificadas pelo método de *Western Blotting* em crianças com toxoplasmose congênita.

Profile of proteins of *T.gondii* identified by the *Western Blotting* method in children with congenital toxoplasmosis.

Thaís Cabral Monica^{1*}, Jaqueline Dario Capobiango², Ricardo Luís Nascimento de Matos¹, Edna Maria Visocci Reiche³, João Luis Garcia¹, Regina Mitsuka-Breganó¹, Itamar Teodorico Navarro¹.

1 - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Londrina, PR, Brasil.

2 – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica, Londrina, PR, Brasil.

3 - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia, Londrina, PR, Brasil.

RESUMO

A toxoplasmose congênita (TC) é assintomática na maioria das crianças ao nascimento. No entanto, se não diagnosticada e não tratada, a criança infectada pode desenvolver deficiência visual e/ou neurológica ao longo da vida. Por isso, o seguimento sorológico é a única maneira possível de detectar a infecção na criança. O método de *Western Blotting* (WB) é uma ferramenta para o diagnóstico de TC, auxiliando no tratamento precoce. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de proteínas do *T. gondii* identificadas pelos anticorpos IgG em crianças com TC, utilizando o método de WB. Os critérios para definir o WB como positivo foram: apresentação de uma ou mais bandas diferentes ou de maior intensidade na criança em relação às bandas maternas ou persistência de bandas reagentes após os 12 meses de vida. Durante os anos de 2014 a 2018, 92 crianças foram acompanhadas para avaliação de TC por WB, 33 (35,9%) foram diagnosticadas com TC e 78,8% (26/33) apresentaram alguma alteração no exame de WB, 69,3% (18/26) dessas crianças apresentaram alteração no exame ao nascer e 30,7% (8/26) após um mês de vida. A variação do peso molecular de proteínas reconhecidos pelo soro da criança apresentado foi de 250kD a 10kD. A mais presente foi a de 90kD (26,3%), seguida por 149kD (22,2%) e 28kD (19,2%). Entre as crianças com TC em 9 (27,3%) só foi possível o diagnóstico pelo WB, pois elas não apresentaram IgM ou IgG anti-*T. gondii* reagente por exame de quimioluminescência (QL) ou outro sinal clínico de infecção. Com a grande variação de cepas de *T. gondii* encontradas no Brasil é fundamental identificar o padrão de

1 proteínas do parasita reconhecidas pelos anticorpos de crianças infectadas, contribuindo para o
2 diagnóstico destas crianças.

3 Palavras-chave: Toxoplasmose congênita, *Western Blotting*, *Toxoplasma gondii*, sorologia.

4

5

ABSTRACT

6

7 Congenital toxoplasmosis (CT) is asymptomatic in most children at birth. However, if
8 undiagnosed and untreated, the infected child may develop visual and / or neurological
9 impairment throughout life. Therefore, serological follow-up is the only possible way to detect
10 the infection in the child. The *Western Blotting* method (WB) is a tool for the diagnosis of CT,
11 aiding in the early treatment. The objective of this work was to evaluate the profile of *T. gondii*
12 proteins identified by IgG antibodies in children with CT, using the WB method. The criteria
13 for defining WB as positive were: presentation of one or more different or higher intensity
14 bands in the child in relation to maternal bands or persistence of bands after 12 months of age.
15 From 2014 to 2018, 92 children were followed for CT evaluation by WB, 33 were diagnosed
16 with CT and 78.8% (26/33) presented some alteration in the WB exam, 69.3% (18/26) of these
17 children presented alterations in the exam at birth and 30.7% (8/26) after one month of life. The
18 variation of the molecular weight of proteins recognized by the child serum presented was from
19 250kD to 10kD. The most present was 90kD (26.3%), followed by 149kD (22.2%) and 28kD
20 (19.2%). Among the children with CT in 9 (27,3%), the diagnosis was only possible by WB
21 because they did not present IgM or IgG anti-*T. gondii* by chemiluminescent (CL) examination
22 or other clinical sign of infection. With the wide variation of *T. gondii* strains found in Brazil,
23 it is essential to identify the pattern of parasite proteins recognized by the antibodies of infected
24 children, contributing to the diagnosis of these children.

25 Key words: congenital toxoplasmosis, *Western Blotting*, toxoplasma, serology.

26

INTRODUÇÃO

27

28
29 A toxoplasmose congênita (TC) ocorre quando uma mulher é infectada por *Toxoplasma*
30 *gondii* durante a gravidez e pode levar a uma ampla variedade de manifestações no feto e na
31 criança, no entanto a maioria é assintomática ao nascimento. Porém, muitas crianças
32 desenvolvem manifestações oculares e/ou neurológicas durante o crescimento (REMINGTON,
33 2011; DUBEY & JONES, 2008). São doenças de notificação obrigatória no Brasil desde 2016,
34 os casos de surtos e de toxoplasmose gestacional e congênita (BRASIL, 2016). São

1 consideradas suspeitas as crianças cujas mães tiveram toxoplasmose aguda durante a gravidez;
2 portanto, essas crianças devem ser submetidas à investigação sorológica para definição da
3 infecção (AAP, 2018; REMINGTON, 2011).

4 O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose congênita ainda é um desafio, além da
5 complexidade da interpretação dos exames sorológicos, a falta de laboratórios de referência
6 para toxoplasmose e a variação de produção de anticorpos a diferentes proteínas do *T. gondii*
7 dificultam a interpretação dos resultados, podendo resultar no diagnóstico e tratamento tardio
8 da criança (CASTILHO-PELOSO et al., 2005; CAMPOS et al., 2017). Portanto há uma
9 necessidade de aplicação de metodologias novas, como determinar um padrão proteico das
10 cepas encontradas no Brasil, para facilitar o diagnóstico precoce da criança.

11 O método de *Western Blotting* (WB) é uma técnica que se baseia na transferência de
12 proteínas específicas do agente para analisar perfis de anticorpos aos diferentes antígenos. Na
13 toxoplasmose congênita essa técnica é empregada para demonstrar a presença de anticorpos
14 específicos para os diferentes marcadores antigênicos, o que permite distinguir anticorpos
15 maternos daqueles produzidos pela criança (REMYINGTON, et al. 2011; GONZÁLES-ACHAR
16 et al., 2018).

17 O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil proteico reconhecido por anticorpos IgG anti-
18 *T. gondii* encontrado nas amostras de crianças com toxoplasmose congênita utilizando o método
19 de *Western Blotting*.

21 **METODOLOGIA**

23 **População de estudo**

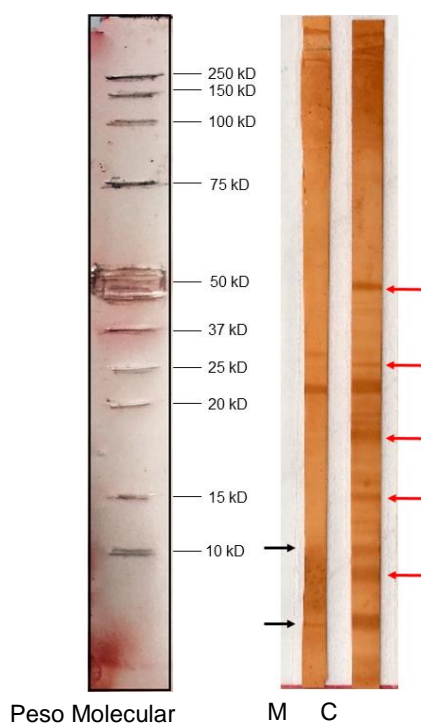
24 Foi realizado um estudo prospectivo de junho de 2014 a junho de 2018 onde, 92 crianças
25 suspeitas de toxoplasmose congênita foram acompanhadas no ambulatório de Moléstias
26 Infeciosas do Hospital Universitário na cidade de Londrina – PR. O estudo foi aprovado pelo
27 comitê de ética envolvendo seres humanos, sobre o CAAE: 91270818.3.0000.5231.

29 **Confirmação congênita**

30 Para a confirmação da toxoplasmose congênita a criança tinha que apresentar IgM anti-
31 *T. gondii* reagente e/ou lesão ocular característica da toxoplasmose e/ou lesão do SNC
32 (calcificações, microcefalia, hidrocefalia) e/ou IgG anti – *T. gondii* após 12 meses de vida por
33 quimioluminescência (QL) e/ou WB positivo (AAP, 2018; REMINGTON et al, 2011)

1 Exame de *Western Blotting*

2 O exame foi realizado comparando-se o perfil de proteínas reconhecidas pelo soro da
 3 mãe e da criança do nascimento até o terceiro mês de vida, e posteriormente as proteínas
 4 reconhecidas pela criança até os 18 meses de vida. Para o WB ser considerado positivo a criança
 5 teria que apresentar uma ou mais bandas diferentes ou de maior intensidade em relação às
 6 bandas maternas ou persistir com pelo menos uma banda reagente após os 12 meses de vida,
 7 para detecção de IgG anti-*T. gondii* (REMINGTON, et al. 2011; AAP, 2018) (Figura 1). Dados
 8 referentes ao acompanhamento da criança e da mãe foram coletados no sistema integrado do
 9 HU (Laudhos e Labhos) e dos prontuários médicos.
 10



11
 12

13 Figura 5 – Exemplo de diferentes padrões de proteínas reconhecidas por anticorpos IgG anti-
 14 *T. gondii* nas amostras do binômio mãe/criança pelo método de *Western Blotting*. Setas pretas
 15 identificam bandas com intensidade maior na criança (C) do que na mãe (M), setas vermelhas
 16 identificam bandas diferentes entre os mesmos.
 17

18 Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western Blotting*

19 As proteínas de taquizoítos provenientes de cepa RH foram sonicadas a 23kHz, seis
 20 vezes por 30 minutos a 4°C e posteriormente quantificadas por Kit Micro BCA™ Protein Assay
 21 (Thermo Scientific™. Waltham, Massachusetts, EUA). Foram separadas por eletroforese de
 22 SDS-PAGE vertical em gel a 12% e 5% (TOWBIN, 1979). As amostras aplicadas foram

1 diluídas em tampão de amostra e como curva de referência foi utilizado o marcador Unstained
2 Protein Standards™ (Precision Plus Protein™, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Califórnia,
3 EUA). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas por eletroforese para
4 membrana de nitrocelulose (iBlot Transfer Stacks Nitrocellulose, Regular size, Invitrogen™,
5 Carlsbad, Califórnia, EUA) em sistema de transferência semi-seco (iBlot Gel Transfer System,
6 Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Após a
7 transferência, a membrana foi bloqueada em solução de bloqueio (7Mm Na₂HPO₄, 3Mm
8 NaH₂PO₄, 140mM NaCl com 1% de caseína) por 3 horas ou overnight a temperatura ambiente,
9 lavadas três vezes com tampão de lavagem. As tiras de nitrocelulose foram incubadas com
10 amostras de soro (das gestantes e das crianças), diluídas a 1:50 em tampão de lavagem (7Mm
11 Na₂HPO₄, 3Mm NaH₂PO₄, 140mM NaCl com 1% caseína) por 1h30min. Após três lavagens
12 com tampão de lavagem, as tiras foram incubadas a temperatura ambiente por 1h30min, com
13 anticorpos anti-IgG humanos marcados com peroxidase, diluídos 1:2000 em tampão de
14 lavagem (Bethyl Lab, Montgomery, TX, USA). A atividade da peroxidase foi revelada pela
15 adição de solução de substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂. Quando as bandas
16 eram observadas, a reação era interrompida com água destilada. Soros controles positivo e
17 negativo para o *T. gondii* foram incluídos em cada teste. Este protocolo foi modificado a partir
18 do citado por Capobianco, et al. 2016. A leitura do WB foi realizada por duas pessoas com
19 100,0% de concordância.

20

21 **Análise estatística**

22 Todos os dados obtidos foram digitados em uma planilha do Programa EXCELL
23 (Windows Microsoft) para posterior análise estatística. A frequência utilizada nas análises foi
24 feita a partir do programa estatístico EPIINFO 3.5.1 (DEAN et al., 1996). O programa
25 OriginPro8® foi utilizado para medição das bandas de WB.

26

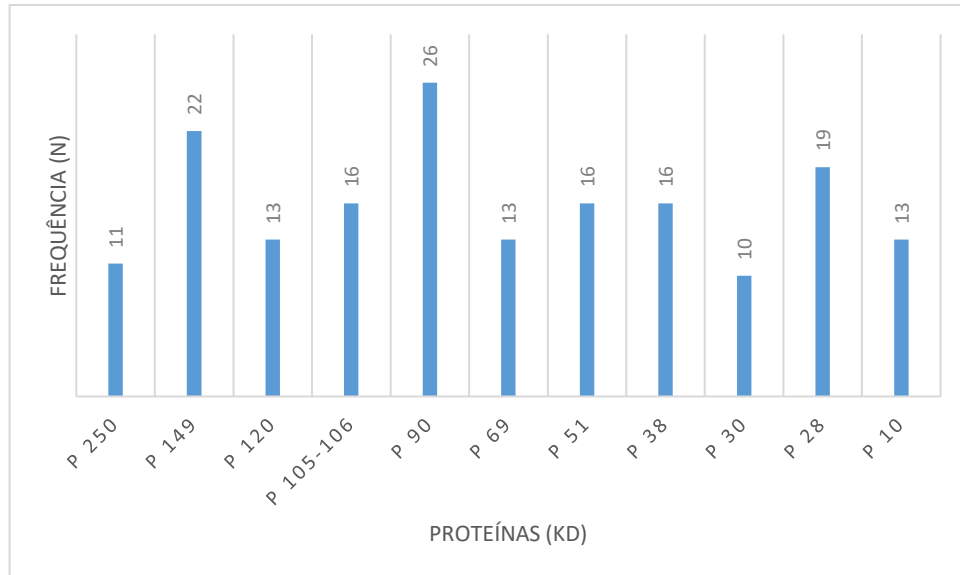
27 **RESULTADO**

28

29 Do total de 92 crianças atendidas, 33 foram diagnosticadas com TC. Em 9 crianças
30 (27,3%) só foi possível o diagnóstico da TC pelo WB, pois elas não apresentaram IgM ou IgG
31 reagente por exame de QL ou outro sinal clínico de infecção. 78,8% (26/33) apresentaram
32 alguma alteração no exame de WB, 69,3% (18/26) dessas crianças apresentaram positividade
33 no exame de WB ao nascer e 30,7% (8/26) após um mês de vida. Dentre as leituras encontradas
34 no WB 42,4% (14/26) eram de bandas diferentes entre mãe e criança, 27,3% (9/26) eram de

1 uma ou mais bandas de maior intensidade na criança e 9,1% (3/26) continham esses dois
 2 padrões no WB na amostra da criança em comparação com a mãe.

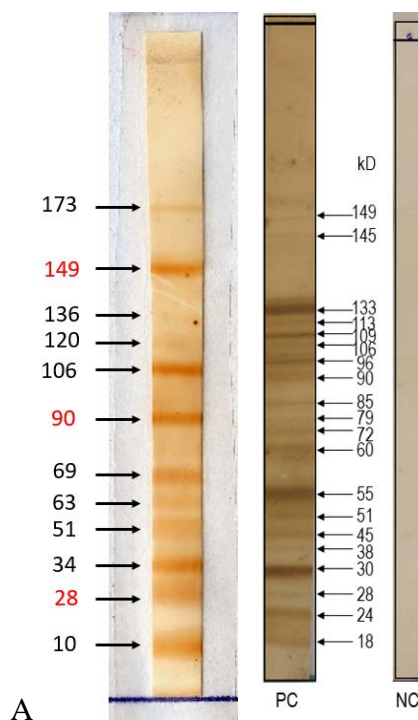
3 A variação do peso molecular de proteínas reconhecidas foi de 250kD a 10kD. As mais
 4 frequentes nas crianças foram 90kD (26,3%), seguida por 149kD (22,2%) e 28kD (19,2%).
 5 (Figura 6 e 7).



6

7 Figura 6 – Distribuição das proteínas de *Toxoplasma gondii* mais reconhecidas, segundo o peso
 8 molecular, nas crianças com toxoplasmose congênita atendidas no Hospital Universitário de
 9 Londrina – PR.

10



11

1 Figura 7 – Exemplo de bandas relativas as proteínas mais reconhecidas nas crianças com
2 toxoplasmose congênita obtidas pelo exame de *Western Blotting*. (A) Bandas reconhecidas
3 em soro de criança. PC: Controle Positivo; NC: Controle negativo.

4
5 Ao analisar as proteínas reconhecidas pelos anticorpos das crianças com mães tratadas
6 *versus* crianças com mães não tratadas, encontramos que as crianças com mães tratadas
7 reconheciam anticorpos para 4 proteínas mais frequentes (p149, p96, p90 e p28), já as crianças
8 de mães não tratadas reconheciam anticorpos para 6 proteínas mais frequentes (p149, p112,
9 p59, p46, p38 e p22).

10

11 **DISCUSSÃO**

12

13 Na década de 90, pesquisadores encontraram uma variedade baixa de anticorpos para
14 proteínas do *T. gondii* com *imunoblot* com peso molecular entre 90-35 kD (GAVINET et al.,
15 1997; ROBERT-GANGNEUX et al., 1999). Capobianco, et al. (2016) em estudo anterior,
16 obtiveram também uma variação menor de proteínas, com peso molecular entre 94 e 2 kD,
17 tendo a p94, p44 e p31 e p30 como as mais frequentes reconhecidas por anticorpos IgG anti-*T.*
18 *gondii*. Outros autores demonstram uma variedade alta de proteínas com peso molecular entre
19 116 e 2 kD (MACHADO et al., 2010; GONZÁLES-ACHAR et al., 2018). No presente estudo,
20 identificamos o reconhecimento para uma maior variedade de proteínas.

21 Potasman et al. (1986) demonstraram que a p30 é um dos antígenos reconhecidos no soro
22 humano e, por ser muito imunogênica, induz a produção de anticorpos IgG, IgM e IgA, podendo
23 ser usada no diagnóstico da infecção aguda ou crônica em adultos e na forma congênita, essa
24 proteína é a utilizada em exames como a QL e em alguns *kits* de *imunoblot* comerciais como
25 marcador principal da toxoplasmose (Aubert et al., 1999). Porém, nosso trabalho demonstrou
26 que as proteínas mais reconhecidas no seguimento da criança com TC foram a p149, p 90 e p
27 28, o que pode justificar o resultado negativo na QL nas 9 crianças que foram diagnosticadas
28 somente pelo WB.

29 O WB foi utilizado para diferenciar infecção aguda e crônica por *T. gondii* em gestantes
30 (Marcolino et al, 2000; Gonzáles-Achar et al, 2018). Marcolino et al. (2000), realizaram a
31 determinação da avidéz do anticorpo imunoglobulina G (IgG) por uma técnica modificada de
32 *Western Blotting*, e definiu que a p38 foi um ótimo marcador antigênico de baixa avidéz para
33 formas recentes de toxoplasmose. Não realizamos dissociação com ureia, porém a p38 foi
34 localizada em 16.1% das amostras analisadas, no entanto essa porcentagem é muito baixa para

1 ser denominada marcador de fase aguda, além do que estas crianças podem ter se infectado no
2 início da gestação.

3 Marcolino et al. (2000) relataram que o antígeno p30 não foi um bom marcador para
4 distinguir infecção aguda de crônica, uma vez que os anticorpos IgG correspondentes foram
5 determinados como tendo alta avidéz em ambas as fases da infecção.

6 As diferenças encontradas neste estudo em comparação a outros trabalhos podem ser
7 relacionadas a diferença de metodologia aplicada ao WB entre os laboratórios. Outra explicação
8 é a diversidade genética entre cepas de *T. gondii*, que pode levar ao reconhecimento de
9 diferentes proteínas, além do fato de alguns indivíduos apresentarem IgG anti-*T. gondii* que
10 reconhece múltiplas proteínas, enquanto outros, uma única proteína (FERREIRA et al. 2006).

11 Para o WB ser considerado positivo a criança deveria apresentar (i) bandas diferentes
12 da mãe ou (ii) bandas com intensidade maior do que a encontrada na mãe (REMINGTON et al,
13 2011). A maioria dos autores tem esse parâmetro para análises do WB, porém Tissot – Dupont
14 et al. (2003), ao analisar amostras de 123 recém-nascidos com suspeita de toxoplasmose
15 observaram que quatro crianças apresentavam bandas de intensidade maior, porém não foram
16 diagnosticadas com TC, levando a conclusão, em seu trabalho, que a posição idêntica de bandas
17 de intensidade diferentes deve ser considerada um equívoco. Este fato não foi observado em
18 nosso trabalho, já que todas as crianças com bandas de maior intensidade que a materna no WB
19 apresentaram também outro critério para a confirmação da TC e nenhuma das crianças que não
20 apresentavam TC tinham diferença de intensidade das bandas em comparação com as mães.

21 O tratamento da gestante e da criança logo após o nascimento podem interferir na
22 resposta para algumas proteínas do *T. gondii*. Em nosso trabalho o perfil de proteínas
23 reconhecidas foi diferente entre as crianças de mães tratadas e não tratadas. Além do mais, WB
24 positivo foi mais encontrado em crianças que fizeram a coleta ao nascer (69,3%) do que nas
25 que tiveram coleta entre 1 e 3 meses (30,7%).

26 A detecção de IgG anti-*T. gondii* neosintetizada é de suma importância para o
27 diagnóstico de TC, especialmente quando IgM ou IgA anti-*T. gondii* não é detectada ao
28 nascimento. Um diagnóstico precoce de crianças infectadas deve ser fornecido para iniciar o
29 tratamento específico, uma vez que o início tardio da terapia é um fator importante que contribui
30 para sequelas graves (ROBERT-GANGNEUX et al., 1999).

31

32 **CONCLUSÃO**

33 As proteínas de WB mais reconhecidas pelas crianças infectadas pelo *T. gondii* foram
34 149kD, 90kD e 28kD e diferem das proteínas inseridas nos testes de QL e conjuntos de

1 reagentes comerciais (*kits*). A porcentagem de WB positivo é maior no primeiro mês de vida
2 com 69,3% de positivos e 30,7% de positividade entre 1 e 3 meses de vida da criança. A
3 detecção de anticorpos IgG que reconhecem proteínas diferentes no WB em amostras da mãe e
4 criança e/ou a presença de uma ou mais bandas com intensidade diferente na criança e/ou a
5 persistência de bandas após os 12 meses de vida demonstraram que a IgG anti-*T. gondii*
6 neosintetizada é de extrema importância no diagnóstico precoce da doença.

7

8 **Suporte Financeiro:**

9 CAPES – Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior.

10

11 **Conflito de Interesses:**

12 There are no known conflicts of interest associated with this work.

13

14 **Agradecimentos:**

15 Ao Hospital Universitário de Londrina e a CAPES pelo financiamento do projeto.

16

17 **REFERÊNCIAS**

18

19 AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Report of Committee on Infectious Diseases.
20 *Toxoplasma gondii* infections (Toxoplasmosis). In: American Academy of Pediatrics. **Red**
21 **Book**. 31st. ed Illinois: Elk Grove Village; 2018, p. 809-820.

22

23 AUBERT, D., MAINE, G.T., VILLENA, I., HUNT, J.C., HOWARD, L., SHEU, M.,
24 BROJANAC, S., CHOVAN, L.E., NOWLAN, S.F., PINON, J.M.. Recombinant antigens to
25 detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera
26 by enzyme immunoassay. **J. Clin. Microbiol.** 2000. 38, 1144–50.

27

28 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a
29 Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública
30 nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo,
31 e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2016.

32

33 CAMPOS, F. A.; ANDRADE, G. M. Q.; TIBÚRCIO, J. D.; et al. Treat or not to treat infant
34 with possible congenital toxoplasmosis? Diagnostic classification system could aid decision.
35 **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 27, n. Supl 3, p. 16–24, 2017. Disponível em:
36 <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2238-3182.20170025>>.

37

38 Capobiango, J.D., Monica, T.C., Ferreira, F.P., Mitsuka-Breganó, R., Navarro, I.T., Garcia,
39 J.L., Reiche, E.M.V., 2016. Evaluation of the *Western Blotting* method for the diagnosis of
40 congenital toxoplasmosis. **J. Pediatr. (Rio. J)**. 92, 616–623.

41 <https://doi.org/10.1016/j.jped.2016.02.014>

- 1
2 CASTILHO-PELLOSO, M. P.; MORAIS FALAVIGNA, D. L.; DE ARAÚJO, S. M.;
3 FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Monitoramento de gestantes com toxoplasmose em
4 serviços públicos de saúde. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.
5 6, p. 532–533, 2005.
- 6
7 DEAN, J. A.; COULOMBIER, D.; BURTON, A. H.; et al. Epi Info , Version 6: a word
8 processing, data bases, and statistic program for epidemiology on microcomputers. **CDC**, p.
9 599, 1996.
- 10
11 DUBEY, J. P.; JONES, J. L. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United
12 States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1257–1278, 2008.
- 13
14 FERREIRA, A. DE M.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic
15 analysis of natural recombinant Brazilian Toxoplasma gondii strains by multilocus PCR–RFLP.
16 **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 1, p. 22–31, 2006. Disponível em:
17 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713480500002X>>. .
- 18
19 GAVINET, M. F.; ROBERT, F.; FIRTION, G.; et al. Congenital toxoplasmosis due to maternal
20 reinfection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1276–1277,
21 1997.
- 22
23 GONZÁLEZ-ACHAR, I.; GONZÁLEZ-VATTEONE, C.; ARÉVALO-DE GUILLÉN, I.; et
24 al. Perfil antigénico en fase aguda y crónica de toxoplasmosis en embarazadas por la técnica de
25 *Western Blot*. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 16, n.
26 3, p. 35–43, 2018. Disponível em:
27 <[http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282018000300035&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
28 [95282018000300035&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282018000300035&lng=es&nrm=iso&tlng=es)>.
- 29
30 MACHADO, A. S.; ANDRADE, G. M.; JANUÁRIO, J. N.; et al. IgG and IgM *Western Blot*
31 assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.
32 105, n. 6, p. 757–761, 2010. Brazil: Fundacao Oswaldo Cruz. Disponível em:
33 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000600005&lang=pt)
34 [02762010000600005&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000600005&lang=pt)>.
- 35
36 MARCOLINO, P T; SILVA, D A; LESER, P G; CAMARGO, M E; MINEO, J R. Molecular
37 markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of
38 immunoglobulin G avidity by *Western Blotting*. **Clinical and diagnostic laboratory**
39 **immunology**, v. 7, n. 3, p. 384–9, 2000.
- 40
41 POTASMAN, I.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Toxoplasma antigens recognized by
42 naturally occurring human antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 1050–
43 4, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3536997>>.
- 44
45 REMINGTON J.S., MCLEOD R., WILSON C.B., DESMONT G. in: Remington and Klein.
46 **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 2011, 7th ed. Elsevier Saunders:
47 Philadelphia. p 918-1041.
- 48
49 ROBERT-GANGNEUX, F.; COMMERCE, V.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-
50 CAMET, J. Performance of a *Western Blot* assay to compare mother and newborn anti-

1 Toxoplasma antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **European**
2 **journal of clinical microbiology & infectious diseases**: official publication of the European
3 Society of Clinical Microbiology, v. 18, n. 9, p. 648–54, 1999. Disponível em:
4 <<http://link.springer.com/10.1007/s100960050366>>.

5
6 TISSOT-DUPONT, D.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; et al.
7 Usefulness of *Western Blot* in serological follow-up of newborns suspected of congenital
8 toxoplasmosis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**: official
9 publication of the European Society of Clinical Microbiology, v. 22, n. 2, p. 122–5, 2003.
10 Disponível em:
11 <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12627289)
12 &list_uids=12627289>.

13
14 TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from
15 polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of**
16 **the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4,
17 1979. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bies.950190612>>. .

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

7 CONCLUSÃO

A técnica de Western Blot mostrou maior positividade para o diagnóstico da toxoplasmose congênita nos primeiros meses de vida da criança e mostrou negatividade ao longo do seguimento sugerindo a exclusão do diagnóstico da TC, houve uma diminuição dos casos com sequelas da TC em relação a estudos anteriores devido ao tratamento mais frequente das mães (84%). Em 32% (8/25) as crianças foram diagnosticadas com TC somente pelo WB, por não apresentarem IgG/IgM anti-*T.gondii* reagente e serem assintomáticas.

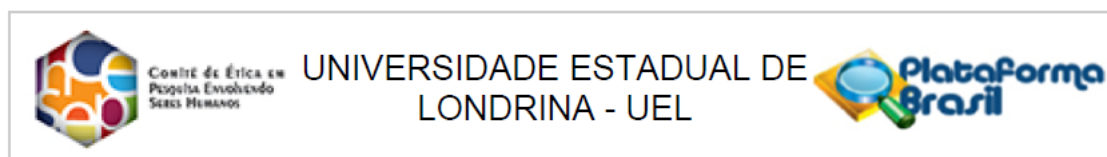
As proteínas de WB mais reconhecidas pelas crianças infectadas pelo *T. gondii* foram 149kD, 90kD e 28kD e diferem das proteínas inseridas nos testes de QL e conjuntos de reagentes comerciais (*kits*). A porcentagem de WB positivo é maior no primeiro mês de vida com 69,3% de positivos e 30,7% de positividade entre 1 e 3 meses de vida da criança. A detecção de anticorpos IgG que reconhecem proteínas diferentes no WB em amostras da mãe e criança e/ou a presença de uma ou mais bandas com intensidade diferente na criança e/ou a persistência de bandas após os 12 meses de vida demonstraram que a IgG anti-*T. gondii* neosintetizada é de extrema importância no diagnóstico precoce da doença.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

ANEXO

ANEXO A

1 Parecer do Comitê de Ética:



Continuação do Parecer: 2.786.206

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1096887.pdf	17/07/2018 12:17:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleModeloCriacAdolescThais.doc	17/07/2018 12:17:23	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleModeloAdultoThais.doc	17/07/2018 12:17:09	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetodePesquisaThaisCabralMonica.pdf	10/07/2018 11:09:18	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito
Outros	TermodeConfidencialidadeeSigiloThais.pdf	10/07/2018 11:07:46	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaobiorrepositorioThais.pdf	10/07/2018 11:06:18	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito

2

Outros	TermodeConfidencialidadeeSigiloThais.pdf	10/07/2018 11:07:46	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaobiorrepositorioThais.pdf	10/07/2018 11:06:18	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito
Outros	ParecerHUItalmarTeodoricoNavarro.pdf	09/06/2018 21:12:57	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito
Declaração do Patrocinador	AprovacaoProrrogaçao.doc	20/03/2018 10:54:05	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostothais.pdf	20/03/2018 10:50:28	ITALMAR TEODORICO NAVARRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: LABESC - Sala 14**Bairro:** Campus Universitário**CEP:** 86.057-970**UF:** PR**Município:** LONDRINA**Telefone:** (43)3371-5455**E-mail:** cep268@uel.br