

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TESTES DE ELISA
CONVENCIONAL (SORO) E PAPEL FILTRO (SANGUE SECO)
PARA DETECÇÃO DE TOXOPLASMOSE IgM**

ANA LUCIA MULAZZANI MINUZZI

Brasília – DF, 2008

ANA LUCIA MULAZZANI MINUZZI

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TESTES DE ELISA
CONVENCIONAL (SORO) E PAPEL FILTRO (SANGUE SECO)
PARA DETECCAO DE TOXOPLASMOSE IgM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz

Brasília – DF, 2008

Minuzzi, Ana Lucia M.

Análise comparativa entre testes de ELISA convencional (soro) e papel filtro (sangue seco), para detecção de Toxoplasmose IgM.

Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2008

Dissertação: Mestre em Ciências da Saúde

- 1- Papel Filtro
- 2- Toxoplasmose
- 3- Transmissão vertical
- 4- Toxoplasmose Congênita

I. Universidade de Brasília

II. Título

DEDICATÓRIA

A minha mãe Eva, por sua infinita dedicação às minhas
filhas e pelo apoio e ajuda em todos os momentos de
minha vida.

Às minhas filhas Liz e Laura por sua imensa compreensão
e para as quais eu gostaria de alguma forma, de servir de
exemplo.

Ao meu esposo, meu grande amor e companheiro, nestes
24 anos de convivência.

Ao Peixoto, grande amigo e colega de faculdade, o qual é
exemplo de dedicação e perseverança para todos os
amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por participar de todos os momentos de minha vida;

Ao meu amigo Carlos Augusto de Oliveira Botelho, pelas oportunidades oferecidas;

Aos colegas do IDP - APAE de Goiânia, em especial a Aline Folador e Gisele Folador, pela dedicação e ajuda neste trabalho;

Ao Prof. Carlos Alberto Bezerra Tomaz, pela disponibilidade, sugestões e correções oportunas;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – UnB;

A toda minha família, em especial minha mãe Eva Minuzzi e meu pai Hermes Minuzzi, por toda a ajuda, carinho e compreensão, nesta jornada;

As minhas colaboradoras Maria de Lourdes e Joélia, sem as quais, não teria conseguido manter a organização e as necessidades diárias do cotidiano de um lar;

Ao meu esposo José Vicente, pelo incentivo e participação neste projeto e por não me deixar desistir quando o tempo para realizar todas as obrigações de mãe, profissional, estudante, filha e esposa parecia ser pouco;

Às minhas filhas Liz e Laura, pela sua infinita paciência e compreensão em aguardar as infinitas horas de estudo;

Ao Dr. Clidenor Gomes Filho, pela inestimável colaboração, sugestões e apoio em todos os momentos do Programa de Proteção à Gestante do Estado de Goiás;

A Dra. Maria Cristina Lisboa Machado, a quem devo a base do meu aprendizado profissional.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS

INTRODUCAO	12
1.1 Toxoplasmose Febril Aguda.....	15
1.2 Linfadenite Toxoplasmica	16
1.3 Toxoplasmose Ocular	16
1.4 Toxoplasmose Congênita	16
1.5 Diagnostico Imunológico	18
1.5.1 Reação de Neutralização	19
1.5.2 Reação de Sabin-Feldman	19
1.5.3 Reação de Fixação de Complemento.....	19
1.5.4 Reação de Hemaglutinacao Indireta	19
1.5.5 Reação de Imunofluorescencia Indireta	19
1.5.6 Reação Imunoenzimatica (ELISA).....	20
1.6 Reprodutibilidade	21
1.6.1 Índice <i>Kappa</i>	21
1.7 Validade de um teste diagnostico	22
1.7.1 Sensibilidade e especificidade	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. Geral	24
2.2. Especifico	24
3. MATERIAIS E METODOS	25
3.1. População de estudo	25
3.2. Coleta e processamento de amostras	25
3.3. Teste de triagem para Toxoplasmose IgM	27
3.4. Analise Estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escala de concordância do Kappa	22
Tabela 2: Leituras de Absorbância dos controles	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo Evolutivo Toxoplasmose.....	16
Figura 2: Representação esquemática Técnica de ELISA.....	28
Figura 3: Resultados Finais	30

RESUMO

Atualmente o potencial de uso do papel filtro é justificado, pois é um meio barato de coleta, armazenamento e transporte de amostras biológicas, uma vez que o material biológico após a coleta é estável e não infectante. É uma excelente alternativa para países com recursos limitados e com regiões de difícil acesso. A Toxoplasmose é uma doença infecciosa, que requer especial atenção em gestantes, pois se mantém assintomática na grande maioria dos casos, causando seqüelas de intensidade variável ao feto. Objetivo: Comparar os resultados de Anticorpos Anti-Toxoplasma IgM em papel filtro (sangue seco) e soro. Materiais e Métodos: Realizou-se um estudo comparativo com amostras coletadas entre Julho de 2006 e Julho de 2007, provenientes de gestantes atendidas no Programa de Proteção à Gestante do Estado de Goiás e encaminhadas para o Instituto de Diagnóstico e Prevenção da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Goiânia. As amostras são coletadas em papel filtro S&S 903 e posteriormente eluídas para realização dos testes de triagem pré-natal (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovirus, Sífilis, Hepatites B e C, Anti-HIV, Chagas e Anti-HTLV). Foram coletadas 1755 amostras, sendo 1093 amostras negativas para Toxoplasmose IgM, 621 amostras positivas para Toxoplasmose IgM e 41 amostras indeterminadas para Toxoplasmose IgM. As amostras negativas para Toxoplasmose IgM foram provenientes de pacientes presumidamente positivas ou indeterminadas para marcadores de Hepatite B e confirmadas como negativas para Toxoplasmose IgM. As amostras positivas ou indeterminadas para Toxoplasmose IgM, foram provenientes de gestantes que na triagem inicial em papel filtro obtiveram estes resultados. Usou-se como critério de exclusão amostras hemolisadas ou lipêmicas e amostras com volume insuficiente para as devidas determinações. Resultados: Foram analisadas 1755 amostras em papel filtro e soro, onde inicialmente 621 amostras eram positivas, 1093 eram negativas e 41 eram amostras com resultados indeterminados para Toxoplasmose IgM. A concordância de resultados entre os dois métodos foi de 99,12 %. Encontrou-se um Índice *Kappa* de 0,98 (ótima concordância). A Sensibilidade para Toxoplasmose IgM em Papel Filtro foi de 99,83 %, enquanto que a Especificidade para o exame de Toxoplasmose IgM em Papel Filtro ficou em 98,73. Conclusões: A pesquisa de Toxoplasmose IgM em papel filtro é um método confiável para triagem de populações específicas, pois possui uma Sensibilidade de 99,83% e uma Especificidade de 98,73% , com um Índice *Kappa* de 0,98.

Palavras-Chave: Papel filtro, transmissão vertical, toxoplasmose congênita, toxoplasmose.

ABSTRACT

Currently the potential paper filter use is justified, because it is a cheap way of collecting, storage and biological samples transport, since the biological material after collection is stable and not infecting. Is an excellent alternative for countries with limited resources and with difficult access regions. Toxoplasmosis is a infectious disease, that requires special attention to pregnant women, because it remains asymptomatic in most cases, causing injuries of varying intensity to the fetus. Objective: To compare the results of Auto-antibodies Anti-Toxoplasmosis IgM in filter paper (dried blood) and serum. Methods: A study was carried out with collected samples between July 2006 and July 2007, from pregnant women assisted by the Pregnant Women Protection Program of the State of Goiás and routed for the APAE-Goiânia's Prevention and Diagnostic Institute. Samples are collected in filter paper S&S 93 and then eluted for conducting the prenatal triage tests (Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalovirus, Syphilis, Hepatitis B e C, Anti-HIV, Chagas' disease and Anti-HTLV). Were collected 1755 samples, with 1093 negative samples for Toxoplasmosis IgM, 621 positive samples for Toxoplasmosis IgM and 41 undetermined samples for Toxoplasmosis IgM. Negative samples for Toxoplasmosis IgM were coming of vainly positive or undetermined patients for labels of Hepatitis B and confirmed as negative for Toxoplasmosis IgM. Positive or undetermined samples for Toxoplasmosis IgM, were coming of pregnant women with in preliminary triage in filter paper obtained this results. It is used as a criterion for exclusion hemolysate and lipaemic samples with insufficient volume for the necessary determinations. Results: Were analyzed 1755 samples in filter paper and serum, firstly 621 samples were positive, 1093 were negative and 41 were samples with undetermined results for Toxoplasmosis IgM. Results correlation between both methods was 99,12%. *Kappa* index of 0,98 (great agreement) was found. Filter paper sensitivity for Toxoplasmosis IgM was 99,83%, while filer paper specificity for Toxoplasmosis IgM was 98,73%.

Key-words: Filter-paper, vertical transmission, congenital toxoplasmosis, toxoplasmosis

INTRODUÇÃO

O uso de papel filtro (sangue seco) para realização de exames laboratoriais iniciou-se em 1960, quando Dr. Robert Guthrie começou a trabalhar em determinações de fenilalanina e fenilcetonúria em recém-nascidos [16].

Em colaboração com alguns parceiros o NSQAP (*Newborn Screening Quality Assurance Program*) e o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) trabalham há mais de vinte anos com sangue seco, oferecendo assistência técnica, consultoria e treinamento para laboratórios, distribuindo um controle de qualidade mundial (teste de proficiência) para hipotireoidismo, fenilcetonúria, erros inatos do metabolismo e hemoglobinopatias [17].

Vários estudos sentinelas estão sendo realizados na África para detecção de HIV em sangue seco, despontando como uma alternativa viável para substituição da coleta de soro, plasma ou sangue total em países com recursos limitados e em regiões de difícil acesso, pois, a sua coleta é facilitada e não requer refrigeração para o seu transporte. A sensibilidade para o HIV varia de 95 a 100% e a sua especificidade fica em torno de 97%. As vantagens da coleta de sangue em papel filtro, estão bem documentadas[17,23], sendo importante salientar que a coleta em papel filtro pode proporcionar um maior acesso a triagem de patologias em países de difícil acesso e com recursos escassos.

O potencial de uso do papel filtro é justificado, pois é um meio barato de coleta e armazenamento de amostras, uma vez que estas são estáveis e não infectantes e podem ser enviadas para laboratórios especializados não necessitando de refrigeração e acondicionamento especiais, podendo ser transportadas por longas distâncias. O papel filtro está sendo usada para uma diversidade de exames laboratoriais destacando-se a identificação de DNA, marcadores tumorais, dosagens hormonais, determinações bioquímicas e pesquisa de anticorpos.

No Brasil com a obrigatoriedade da realização da Triagem Neonatal (“Teste do Pezinho”) na década de 80, esta técnica em papel filtro tornou-se conhecida e acessível a apenas alguns laboratórios de referência..

Em meados de 2000, um grupo de profissionais da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Campo Grande, referência estadual para o “Teste do Pezinho”, começou a pesquisar a realização de outros exames não pertencentes à “triagem neonatal” (Rubéola IgG/IgM, Toxoplasmose IgG/IgM, Citomegalovírus IgG/IgM, HIV 1 e 2, Sífilis, Chagas,

Hepatite B, Hepatite C e HTLV 1 e 2), em papel filtro S&S 903 (Schleicher & Schuell 903), usando “kits” comerciais. Em 2002, baseados nesta pesquisa, implantou-se um projeto piloto para triagem pré-natal na cidade de Dourados-MS. Após três meses de experiência, a Secretaria Estadual da Saúde do Mato Grosso do Sul ampliou este projeto piloto para todo o estado, implantando assim o Programa de Proteção à Gestante do Mato Grosso do Sul. Em setembro/2003 o Estado de Goiás resolveu, também, realizar este programa, implantando-o primeiro em duas regionais de saúde e ampliando-o gradativamente para todas as Regionais de Saúde do Estado. Hoje este programa está em funcionamento nos estados de Mato Grosso do Sul e Goiás, implantado em 100% dos municípios e também em Maceió e alguns municípios do estado de Alagoas. O Programa de Proteção à Gestante do Estado de Goiás (PPGGO) realiza a triagem de doenças infecciosas passíveis de transmissão vertical tais como: HIV, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovirus, Chagas, Hepatites B e C, Sífilis e HTLV I/II. O PPGGO tem como base a facilidade do acesso da gestante ao pré natal; considerando que está instituído em todas as Unidades de Saúde Públicas e PSF's, com essa forma fácil, rápida e cômoda, tornou-se mais atraente para a gestante fazer seu pré natal. A coleta é realizada através de uma punção digital e preenchendo 6 (seis) círculos no papel filtro S&S 903 e enviada via correios para o laboratório de referência (IDP APAE de Goiânia).

Dentre as patologias triadas, a Toxoplasmose é uma doença infecciosa, congênita ou adquirida, causada pelo *Toxoplasma gondii*, que requer especial atenção em gestantes por ser uma doença de alta prevalência, mas que se mantém assintomática na grande maioria dos casos. Novas feições à Toxoplasmose estão sendo consideradas decorrentes da AIDS, promovendo intensos distúrbios, entre os quais são relevantes os que promovem alterações no SNC (Sistema Nervoso Central), quando o parasita assume o papel de agente oportunista [12].

Sendo a Toxoplasmose uma protozoose de ampla distribuição geográfica, a transmissão congênita pode ocorrer quando a mulher adquire a primo infecção durante a gestação. Destes casos, 90% são assintomáticos ou oligossintomáticos. A infecção fetal pode ser atenuada ou prevenida quando há tratamento materno após um diagnóstico precoce. Em diferentes países, a frequência de aquisição de Toxoplasmose durante a gravidez varia de 1 a 14 casos/1000 gestações; no entanto a infecção congênita ocorre em 0,2 a 2 recém-nascidos/1000 nascimentos [33].

No Brasil, a soroprevalência para Toxoplasmose pode variar de 40 % a 80 %. As maiores preocupações para controle e tratamento dessa patologia fundamentam-se no atendimento de gestantes e recentemente em pacientes imunodeprimidos. A gravidade da doença congênita, determina a importância da triagem da gestante no primeiro trimestre de

gravidez, sendo a triagem sorológica a mais indicada, pois o diagnóstico precoce oferece mais chances de evitar ou reduzir seqüelas ao recém-nascido. A necessidade do diagnóstico precoce e definitivo se faz necessária porque auxilia na prevenção dos casos mais graves [22].

A produção de anticorpos pelo organismo infectado por *T.gondii* é intensa e precoce. A resposta humoral com produção quase que simultânea de anticorpos das classes IgM e IgG permite que os testes sorológicos assumam grande importância para o diagnóstico da doença [31]. A distinção sorológica entre Toxoplasmose aguda ou crônica assume grande importância clínica, principalmente porque a transmissão fetal ocorre no período inicial da infecção, quando a gestante sorologicamente negativa passa a soropositivo. Existem várias provas sorológicas para o diagnóstico de Toxoplasmose: Reação de Hemaglutinação Indireta (HAI), Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Reação Imunoenzimática (ELISA) [6].

Em alguns países como França e Áustria, a pesquisa sorológica é, por lei, obrigatória. Tal procedimento reduziu a incidência de toxoplasmose fetal de 40% para 7% [33].

Este trabalho tem como finalidade avaliar a eficiência do papel filtro na pesquisa de Anti-Toxoplasma IgM pela metodologia de ELISA, realizando um estudo comparativo entre a técnica convencional em soro e a técnica em papel filtro (sangue seco), usando kits comerciais registrados no Ministério da Saúde (ANVISA).

O desempenho de um teste diagnóstico depende da ausência de desvios da verdade e da precisão (o mesmo teste aplicado a mesma amostra deve produzir os mesmos resultados), ou seja, dependem da validade e da reprodutibilidade do teste. Reprodutibilidade é a consistência de resultados quando o exame se repete e validade é a capacidade do teste em determinar o verdadeiro valor do que está sendo medido [1].

A validade e a reprodutibilidade são fundamentais para separar resultados normais e alterados e devem ser adequadamente mensuradas, para avaliar a qualidade de um exame diagnóstico e a informação por ele produzida [1].

A atividade laboratorial, em grande parte depende da execução humana e está sujeita ao aparecimento de erros. Valendo-se desta afirmativa, salientamos que todos os procedimentos laboratoriais devem ser padronizados e obedecer a especificações contidas nos procedimentos da qualidade, diminuindo, assim, o aparecimento de erros, oriundos da atividade humana e possibilitando a implementação de ações corretivas com a finalidade de que o mesmo não aconteça.

É de vital importância que os procedimentos e as técnicas usadas para determinação sorológica sejam padronizadas e validadas para os testes laboratoriais. A qualidade de um

teste diagnóstico baseia-se fundamentalmente na reprodutibilidade de resultados e sensibilidade do teste.

A forma fácil de execução da metodologia em papel filtro (sangue seco), pode tornar acessível a ampliação dos testes laboratoriais e permitir a implementação dessa técnica em programas de saúde da rede pública, principalmente em um país como o Brasil, que possui grandes distâncias geográficas.

A toxoplasmose é uma doença universal, sem preferência de sexo ou raça . Esta doença não é objeto de ações de Vigilância Epidemiológica, entretanto, tem hoje, grande importância para a saúde pública devido a sua associação com a AIDS e pela gravidade dos casos congênitos. As diferenças em função dos fatores geográficos, clima e formas de transmissão, tem sido relatadas, sendo que a soropositividade aumenta com a idade[4]. A infecção toxoplasmática tem distribuição mundial, variando de 70 a 100% de infectividade em indivíduos adultos [11].

No Brasil, a soroprevalência tem sido determinada entre 40% a 80%. Em Recife essa taxa é de 64% , no Rio de Janeiro se observou uma taxa de 79%; em Manaus, de 71%; em São Paulo, de 68%: e entre indígenas brasileiros variou de 52% a 65% [19]. No Centro Oeste encontramos uma prevalência de Toxoplasmose na população geral de 54% [11].

O homem adquire a infecção por três vias:

- Ingestão de oocistos do solo, areia, latas de lixo e em qualquer local onde os gatos defecam, disseminando-se através de hospedeiros transportadores, tais como, moscas, baratas e minhocas.
- Ingestão de cistos em carne crua e mal cozida, especialmente de porco e carneiro.
- Infecção transplacentária, ocorrendo em 40% dos fetos de mães que adquiriram a infecção durante a gravidez [14].

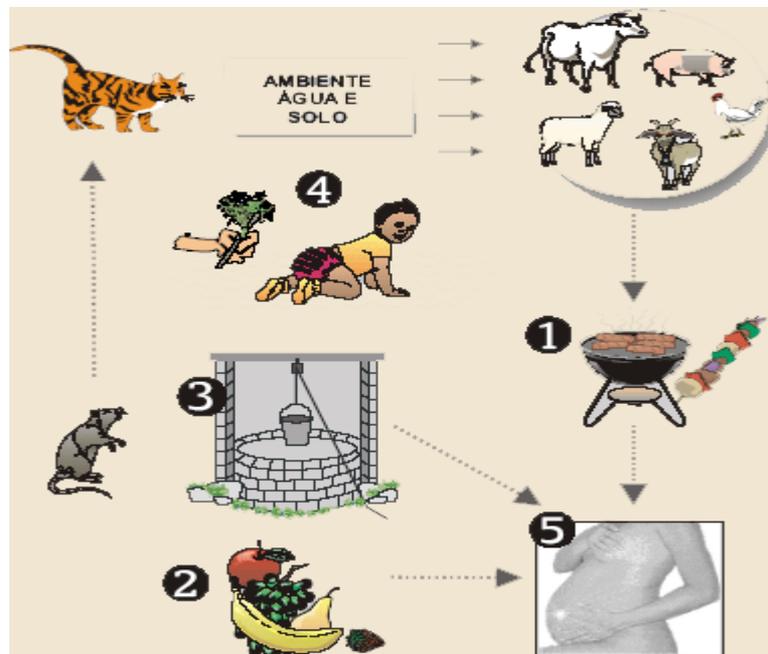
A toxoplasmose não se transmite diretamente de uma pessoa a outra, com exceção das infecções intra-uterinas, sendo uma zoonose cosmopolita, responsável por determinar quadros variados, tais como:

1.1. Toxoplasmose Febril Aguda: na maioria das vezes a infecção inicial é assintomática. Às vezes a infecção pode generalizar-se e ser acompanhada de exantema, com acometimento pulmonar, moicárdico, hepático ou cerebral, porém de evolução benigna.

1.2 Linfadenite Toxoplásmica: geralmente o quadro se caracteriza por linfadenopatia localizada, especialmente em mulheres, ocorrendo mais raramente linfadenopatia generalizada.

1.3 Toxoplasmose Ocular: em 30 a 60% dos casos de pacientes com corioretinite, encontramos toxoplasmose ocular, ocorrendo retinite aguda ou retinite crônica, esta podendo levar à cegueira.

1.4 Toxoplasmose Congênita: resulta da infecção intra-uterina variando de assintomática a fatal, dependendo da idade gestacional e de fatores ainda não bem esclarecidos [3].



Fonte: Fundação Oswaldo Cruz

Figura 1: Ciclo Evolutivo Toxoplasmose

Quando a infecção aguda manifesta-se no primeiro trimestre de gravidez, 14% dos fetos apresentam-se infectados, no segundo trimestre 29% e no terceiro trimestre 59%. Para esse autor, 90% das mães que apresentaram infecção aguda durante a gravidez eram assintomáticas [27]. A incidência de Toxoplasmose aguda na gravidez varia de 0,06% a 1,4% [28], onde aproximadamente 15% das infecções resultam em morte intra-uterina e dos 85% que nascem, 80% desenvolvem lesões oculares ou desordens cerebrais tardias. Tem sido estimado que mais de 9% de retardamento mental está associado à infecção Toxoplasmática Congênita [13].

Quando a infecção materna é diagnosticada no final da gravidez, a mulher pode gerar um bebê aparentemente perfeito, mas os órgãos do recém-nascido vão, aos poucos, sofrendo alterações [8]. Essas crianças, assintomáticas ao nascer podem desenvolver coriorretinite durante a adolescência ou na fase adulta, quando lesões oculares e desordens neurológicas e psicomotoras podem acontecer [13].

Assim, fica evidente a conveniência de se estabelecer, com precocidade o diagnóstico, principalmente porque o tratamento bem instituído é confiável e tende a prevenir problemas futuros [18].

As características clássicas dessa infecção são denominadas de “Tétrade de Sabin” (Sabin,1941) [19]:

- Hidrocefalia ou microcefalia (modificações no volume do crânio);
- Coriorretinite (é a manifestação mais constante e constitui, por si só, elemento significativo para levantar forte suspeita da doença);
- Estrabismo e Nistagmo (movimentos rápidos e involuntários do globo ocular);
- Calcificações Intracranianas (atingem o córtex e os núcleos da base do crânio);
- Retardamento Mental.

A Toxoplasmose do adulto é tratável por associação de medicamentos, mas a lesão do feto é irreversível.

A primo-infecção pelo *Toxoplasma gondii*, frequentemente evolui de forma assintomática. É detectada pela pesquisa laboratorial de marcadores sorológicos durante o acompanhamento pré-natal ou em estudos de soroprevalência. A importância de estabelecer o perfil sorológico da gestante reside na possibilidade de adoção de medidas profiláticas e terapêuticas para minimizar a transmissão vertical e a ocorrência de danos ao desenvolvimento fetal [5].

A toxoplasmose adquirida durante a gestação, por constituir uma das formas de transmissão do parasita, apresenta especial relevância. Em geral, o risco de adquirir toxoplasmose durante o período gestacional, correlaciona-se a três fatores: a prevalência na comunidade, o número de contatos com uma fonte de infecção e o número de mulheres suscetíveis (não imunizadas por infecção prévia) na comunidade. No Brasil, existem estudos sobre prevalência de gestantes soropositivas para IgG Anti-*Toxoplasma gondii* em alguns

estados, como Rio de Janeiro (77,1%), Pernambuco (69,4%), Rio Grande do Sul (74,5%), Bahia (64,9%) e Paraná (67,0%) [33].

Durante a gestação, o risco de transmissão vertical está praticamente restrito às primoinfecções, sendo observado que mulheres que já apresentavam soropositividade antes da gravidez geralmente não infectam seus fetos. O parasita atinge o conceito por via transplacentária causando danos de diferentes graus de gravidade, dependendo da virulência da cepa do parasita, da capacidade da resposta imune da mãe e do período gestacional em que a mulher se encontra. Quando a infecção materna ocorre no primeiro trimestre de gestação, a ocorrência de transmissão vertical é menor do que no terceiro trimestre, contudo a gravidade da doença no recém-nascido é maior [19].

Na fase aguda da toxoplasmose, primeiro ocorre a produção de Imunoglobulina M (IgM), seguida da produção de Imunoglobulina G (IgG). A infecção pode produzir também Imunoglobulina A (IgA), se a transmissão ocorrer por via oral. A detecção de IgM pode ser feita uma a duas semanas depois do início da infecção, alcançando um pico em seis a oito semanas, quando então declinam rapidamente, porém títulos baixos podem persistir por mais de doze semanas. O anticorpo IgG aparece na primeira semana de infecção e persiste por toda a vida na maioria das gestantes.[19]

O diagnóstico da infecção materna é feito pelo perfil sorológico da doença aguda, onde existe positividade tanto para anticorpo IgM como para anticorpo IgG. Como os níveis de anticorpo IgM podem manter-se positivos por até dezoito meses após a infecção, outros métodos devem ser utilizados para diferenciação da infecção aguda ou crônica, como o Teste de Avidéz de anticorpo IgG, demonstrando baixa avidéz (<30%) para os casos cuja infecção ocorreu nas dozes semanas e alta avidéz (>60%) para aquelas ocorridas há mais de doze semanas, lembrando que os casos de avidéz entre 30% e 60% devem ser analisados juntamente com os achados clínicos e anamênese da paciente [11].

O diagnóstico laboratorial constitui um desafio para os profissionais de saúde envolvidos na assistência à gestante e ao conceito com suspeita de infecção pelo *Toxoplasma gondii*. Além da complexidade de interpretação de marcadores de fase aguda, as modernas técnicas laboratoriais nem sempre estão disponíveis nos serviços de saúde pública [5].

1.5. Diagnóstico Imunológico

A distinção sorológica entre Toxoplasmose Aguda ou Crônica assume grande importância clínica, ainda mais sabendo-se que só existe risco de infecção congênita no

período inicial da infecção, extremamente limitado, onde a IgM (característica de fase aguda) permanece positiva por até 18 meses[7].

Diversas provas sorológicas foram preconizadas para o diagnóstico da Toxoplasmose, entre elas as seguintes: Reação de Neutralização, Reação de Sabin-Feldman, Reação de Fixação do Complemento, Reação de Hemaglutinação, Reação de Imunofluorescência, Reação Imunoenzimática (ELISA) [6].

1.5.1. Reação Neutralização

Executada na pele dorsal de coelhos. Esta reação não é praticamente usada porque não distingue Toxoplasmose aguda de Toxoplasmose crônica.

1.5.2. Reação de Sabin-Feldman

É um excelente método para diagnóstico individual na fase aguda ou crônica da doença, é muito sensível e específica. Atualmente este método está em desuso por causa da execução trabalhosa e baixo rendimento, apresentando alguns inconvenientes tais como: necessidade do emprego de Toxoplasma vivos e infectantes; interferência do número de protozoários utilizados e também pela boa sensibilidade de outros testes sorológicos de mais fácil execução [34].

1.5.3. Reação de Fixação de Complemento

É um método de diagnóstico trabalhoso que sofre interferência de muitas variáveis, presentemente enveredando para o desuso.

1.5.4. Reação de Hemaglutinação Indireta

Excelente método diagnóstico, devido a sua alta sensibilidade e simplicidade de execução. Entretanto é inadequado para diagnóstico precoce e frequentemente não detecta Toxoplasmose congênita. A sua reprodutibilidade dos valores fornecidos é irregular pois o exame pode sofrer intervenção de substância antigênica dos camundongos, o armazenamento de hemácias hidratadas ou a demora do manuseio traduz-se em resultados não confiáveis. É um método adequado para levantamento epidemiológicos [2].

1.5.5. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

É o melhor, mais sensível e o mais seguro dos métodos diagnósticos, podendo ser usado tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. Devendo-se salientar que se trata de técnica aplicável em situações apropriadas, já que há a necessidade do uso de aparelhagem de alto custo, exige anticorpo de qualidade, o isotiocianato de fluoresceína é adquirido por alto preço e, finalmente sua interpretação depende de um profissional bem formado pois é subjetivo.

1.5.6. Reação Imunoenzimática (ELISA)

O teste de ELISA tem se tornado um dos testes mais usados atualmente, principalmente para triagem inicial de Toxoplasmose em seres humanos. Ao contrário da IFI é um teste objetivo, e com leitura automatizada.

Os testes de ELISA apresentam maior sensibilidade para pesquisa de anticorpos da classe IgG e a mesma sensibilidade da IFI para pesquisa de anticorpos da classe IgM [33].

A pesquisa de anticorpos IgM por ELISA em sangue seco (papel filtro) é uma metodologia que apresenta alguns pontos positivos, tais como: a coleta e o armazenamento fáceis, necessidade de pouca estrutura e recursos humanos, capacidade de gerar respostas rápidas, baixo custo, não envolvendo os riscos associados à utilização e eliminação de agulhas e seringas. O transporte de amostras convencionais de sangue (via tubos de ensaio) pode alterar as características do sangue se não houver refrigeração adequada e ainda há maiores chances de ocorrer acidentes com o material (quebra). Com o sangue seco (papel filtro), o transporte pode ser feito até pelo correio, sem alteração de resultados [25]. Com isso as amostras podem vir de qualquer local do país, sem alterar os resultados dos exames. Realizou-se um estudo comparativo entre a técnica padrão de ELISA em soro e a técnica alternativa ELISA em sangue seco (papel filtro), existem poucos estudos comparativos sobre esta metodologia, porém exames em sangue seco (papel filtro) são realizados no “Teste do Pezinho” há mais de 20 anos [17].

Na avaliação de testes diagnósticos devemos descrever a intensidade da associação, em termos de sensibilidade e especificidade, não basta mostrar que existe uma associação entre o resultado do teste e a doença [1].

Vários tipos de provas sorológicas são atualmente utilizados para possibilitar o diagnóstico do Toxoplasmose. Constituem exames bastante utilizados para identificação da

doença em pessoas que estão na fase aguda ou crônica da patologia. Os testes mais utilizados atualmente, são a hemaglutinação indireta (HAI), a imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA).

1.6. Reprodutibilidade

É a habilidade do teste em produzir resultados consistentes (quase os mesmos resultados) quando realizados independentemente e sob as mesmas condições. Por si só a reprodutibilidade não qualifica um teste, isto é, o teste pode ter alta reprodutibilidade, mas produzir resultados consistentemente errados. Há diversas maneiras de verificar a concordância de resultados entre leituras de um mesmo evento ou comparar métodos diagnósticos diferentes, e assim, estimar o erro cometido na sua aferição. Os resultados podem ser expressos sob forma de variável dicotômica (positivo/negativo), categórica (normal/anormal/níveis limítrofes), em medidas contínuas (mg, ml) ou títulos de sorologia. A expressão em variáveis dicotômicas torna a interpretação mais útil na prática. A comparação de resultados pode ser apresentada através do Índice *Kappa* (K).[1]

1.6.1. Índice *Kappa*

Expressa a confiabilidade de um teste, é um indicador de concordância ajustada, pois leva em consideração, a concordância devida ao acaso. O K informa a proporção de concordância não-aleatória entre medidas da mesma variável categórica, e seu valor varia de “menos um” (completo desacordo) a “mais um” (concordância total) [1].

Tabela 1: Escala de concordância do Kappa

Kappa	Concordância
<0,00	Nenhuma
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Adaptado de Landis & Koch, Biometrics, 1977

1.7. Validade de um teste diagnóstico

A validade de um teste refere-se à quanto, em termos quantitativos ou qualitativos, um teste é útil para diagnosticar um evento ou para predizê-lo. Para determinar a validade, compara-se os resultados do teste com os de um padrão (padrão ouro). O teste diagnóstico ideal deveria fornecer sempre a resposta correta, ou seja, um resultado positivo nos indivíduos com a doença e um resultado negativo nos indivíduos sem a doença.[1]

1.7.1. Sensibilidade e especificidade

O resultado do teste está correto quando ele é positivo na presença da doença (verdadeiro positivo), ou negativo na ausência a doença (verdadeiro negativo). Por outro lado, o resultado do teste está incorreto quando ele é positivo na ausência da doença (falso-positivo), ou negativo quando a doença está presente (falso-negativo) [1].

SENSIBILIDADE: Capacidade que o teste diagnóstico/triagem apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos.

ESPECIFICIDADE: Capacidade que o teste diagnóstico/triagem tem de detectar os verdadeiramente negativos.

O teste ideal, com 100 % de sensibilidade e especificidade raramente existe na prática, pois a tentativa de melhorar a sensibilidade tem o efeito de diminuir a especificidade (quanto maior a sensibilidade, menor a especificidade). Para a definição do ponto de corte de positividade (cut-off) o investigador deverá levar em conta a importância relativa da sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico, ponderando sobre as implicações dos dois possíveis erros. Para um teste de triagem o ideal é aumentar a sensibilidade em detrimento da especificidade, pois a não detecção de casos acarretará risco para a população, o ponto de corte deverá ser estabelecido tendo como objetivo alcançar 100% de sensibilidade para que não ocorram falsos-negativos [1].

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Comparar os resultados de Anticorpos Anti-Toxoplasma IgM em papel filtro (sangue seco) e soro.

2.2 Específicos:

- Verificar a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos em papel filtro;
- Verificar a especificidade de resultados em papel filtro;
- Verificar a sensibilidade dos resultados em papel filtro;
- Verificar a concordância de resultados entre os dois métodos.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. População de estudo

Realizou-se um estudo comparativo com amostras de sangue coletadas entre Julho de 2006 a Julho de 2007, provenientes de 1755 gestantes atendidas no PPGGO (Programa de Proteção à Gestante do Estado de Goiás) e encaminhadas para o IDP APAE de Goiânia (Instituto de Diagnóstico e Prevenção da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Goiânia).

As amostras de sangue foram coletadas em soro e papel filtro S&S 903 (Schleicher & Schuell 903) por punção digital e posteriormente eluídas para extração das proteínas e posterior realização dos testes de ELISA. Nos casos com resultados iniciais supostamente positivos ou indeterminados foi realizada uma nova coleta em sangue venoso para confirmação de diagnósticos.

Por se tratar de um estudo retrospectivo com utilização do banco de dados secundários disponibilizados pelo IDP APAE de Goiânia, não infringe os aspectos éticos vigentes, estando em consonância com a Resolução 196/96 e Complementares do CONEP/MS, e seguiu a tramitação determinada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Para a execução do projeto de pesquisa foi solicitada a autorização da Presidência da APAE de Goiânia para manipulação do banco de dados secundário.

Foi solicitado a dispensa do Comitê de Ética em Pesquisa por se tratar de um estudo com manuseio somente do banco de dados secundário.

3.2. Coleta e processamento das amostras

Foram coletadas um total de 1755 amostras. As amostras negativas foram provenientes de pacientes que na realização de exames em papel filtro foram presumidamente positivas ou indeterminadas para marcadores de outra patologia (Hepatite B) e negativas para Toxoplasmose IgM. As amostras positivas ou indeterminadas para Toxoplasmose IgM foram provenientes de pacientes que na triagem em papel filtro obtiveram esses resultados.

Usou-se como critério de inclusão pacientes com resultados positivos para Toxoplasmose IgM em papel filtro e positivas para marcadores de Hepatite B em papel filtro que realizaram coleta de material em papel filtro e soro. Usou-se como critério de exclusão

amostras hemolisadas ou lipêmicas e amostras com volume insuficiente para as devidas determinações.

Foram colhidas gotas de sangue periférico em papel filtro (seis circunferências), acoplado a uma ficha padronizada de identificação da gestante, contendo no verso o consentimento informado da gestante para a realização dos testes sorológicos.

Os testes sorológicos foram realizados em aparelhos automatizados, utilizando kits comerciais registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde (ANVISA).

A amostra de sangue foi coletada por punção digital em papel filtro S&S 903, conforme padronização de coleta dos Procedimentos Operacionais Padrão (POP) do IDP APAE de Goiânia. O cartão de coleta deve ser preenchido de maneira legível com dados pessoais da gestante. Para a coleta do sangue em papel filtro, o local da punção, normalmente dedo anelar, deve ser limpo com álcool a 70%, após a secagem do álcool, realiza-se uma punção digital com lancetas descartáveis, com a formação de uma gota de sangue espessa, encosta-se o papel filtro suavemente no local, para que o sangue seja absorvido, repetindo este procedimento até preencher completamente os círculos.

Após a coleta o material foi seco à temperatura ambiente, sem incidência de luz solar, fora de ambiente com ar condicionado ou ventilador, por período de 60 a 90 minutos. Posteriormente as amostras foram embaladas em envelopes padronizados e encaminhados via correios ao IDP APAE de Goiânia. Todas as informações contidas no cartão de coleta foram de responsabilidade da Unidade de Saúde.

No recebimento das amostras no IDP APAE de Goiânia, foram verificadas o correto preenchimento da ficha e viabilidade da amostra, segundo POP onde são realizadas avaliações de qualidade da coleta das amostras. Em seguida as amostras foram identificadas com código de barras e enviadas para picote. As amostras foram picotadas em aparelhos automáticos, seguindo uma lista de trabalho específica para cada reação. Posteriormente as amostras são colocadas em solução tampão para eluição das proteínas sanguíneas e posterior realização dos testes de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

As amostras de sangue venoso foram coletadas nos postos de origem e enviadas via Correios (Sedex), seguindo as normas de biosegurança de material biológico.

3.3. Teste de Triagem para Toxoplasma IgM

Na triagem sorológica para Toxoplasma IgM, em eluato de papel filtro utilizou-se kits comerciais para ELISA, registrados pelo Ministério da Saúde – ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

ELISA: Técnica amplamente utilizada para rotinas de laboratório, excelente como método de triagem por sua alta sensibilidade e adequada especificidade. As amostras em papel filtro são eluídas, usando eluente próprio para este tipo de material biológico e posteriormente a realização do exame segue a técnica descrita nos kits comerciais .

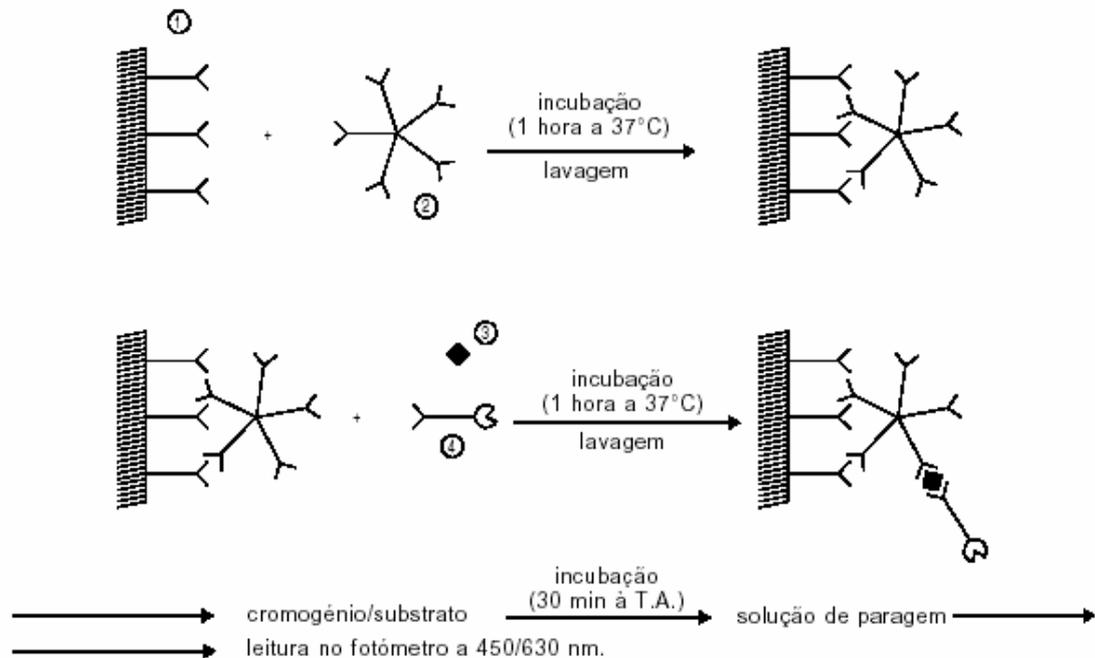
Para extração do anticorpo Anti-Toxoplasma IgM, usamos um picote de 3 mm de diâmetro (3µl de soro) [23] que será colocado para eluição em 200 µl de eluato diretamente na placa de realização do exame. A placa é homogeneizada com rotação de 1000 rpm, à temperatura ambiente por 1 hora e logo após são realizados os exames em aparelhos de ELISA automatizados seguindo a técnica específica

O método imunoenzimático para determinação qualitativa de IgM específica anti-*Toxoplasma gondii* é um teste imunométrico de captura de anticorpos, baseado na técnica de ELISA. A presença de IgM específica anti-Toxoplasma permite que o conjugado ligue-se a fase sólida através da presença do antígeno de Toxoplasma. A atividade enzimática é, portanto, proporcional a concentração de IgM anti-Toxoplasma presente nas amostras ou nos controles. A atividade enzimática é medida pela adição de uma solução incolor de cromógeno/substrato. A ação da enzima no cromógeno/substrato produz uma coloração que é medida por um fotômetro.

Técnica resumida em papel filtro (figura2):

- Dispensar 100 µl dos calibradores e controles nos poços correspondentes.
- Fazer eluição do papel de filtro (nas tiras sensibilizadas) com 200 µl do eluente próprio.
- Incubar a placa durante 60 min a 37°C.
- Lavar com o tampão de lavagem 5x.
- Dispensar 100 µl de conjugado em cada poço.
- Incubar a placa durante 60 min a 37°C.
- Lavar com o tampão de lavagem 5x.
- Dispensar 100 µl de substrato em cada poço.
- Incubar a placa durante 30 min a temperatura ambiente protegido da luz.

- Adicionar 100 μ l da solução de bloqueio em cada poço. Misturar suavemente por 30 segundos.
- Ler imediatamente as DOs em um leitor de microplacas com filtro de 450 nm.



Fonte: IDP- APAE de Goiânia

Figura 2: Representação esquemática Técnica de ELISA

3.4. Análise estatística

A hipótese nula de ausência de concordância entre os resultados obtidos para as medidas dos níveis de anticorpos, obtidos em soro e papel filtro, será testada através da distribuição cruzada das faixas de absorbância obtidas pela ELISA.

Os resultados em papel filtro e soro foram arquivados em planilha Excel. Todos os dados foram conferidos quanto a sua validade e exatidão e posteriormente conferidos com os resultados originais. Para facilitar a análise foi determinado um ponto de corte (cut-off), único para papel filtro e soro, como a realização dos exames foram sendo executadas a medida que as amostras chegavam ao laboratório, esta determinação de cut-off único tornou-se necessária.

Para determinar a Especificidade, a Sensibilidade e o Índice *Kappa* foram utilizadas fórmulas específicas para comparação entre os dois métodos, de acordo com Buck e Gart (1966), assumindo como referência os resultados em soro [1].

		Doença (padrão-ouro)		
		Presente	Ausente	
Teste	Positivo	Verdadeiro positivo a	Falso-positivo b	a + b
	Negativo	Falso-negativo c	Verdadeiro negativo d	c + d
		a + c	b + d	N(a+b+c+d)

Fonte: Adaptado de Zicker, 1997

Sensibilidade: $a/(a+c)$

Especificidade: $d/(b+d)$

O índice *kappa* é estimado como:

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Sendo:

Po = Proporção de concordâncias observadas

Pe = Proporção de concordâncias esperadas

Para uma melhor exatidão de cálculos e resultados, foram usadas variáveis dicotômicas (positivo e negativo), os valores indeterminados foram desprezados para esses cálculos, porém serão descritos posteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

Foram analisadas 1755 amostras em papel filtro, onde inicialmente 621 amostras eram positivas, 1093 eram negativas e 41 eram amostras com resultados indeterminados.

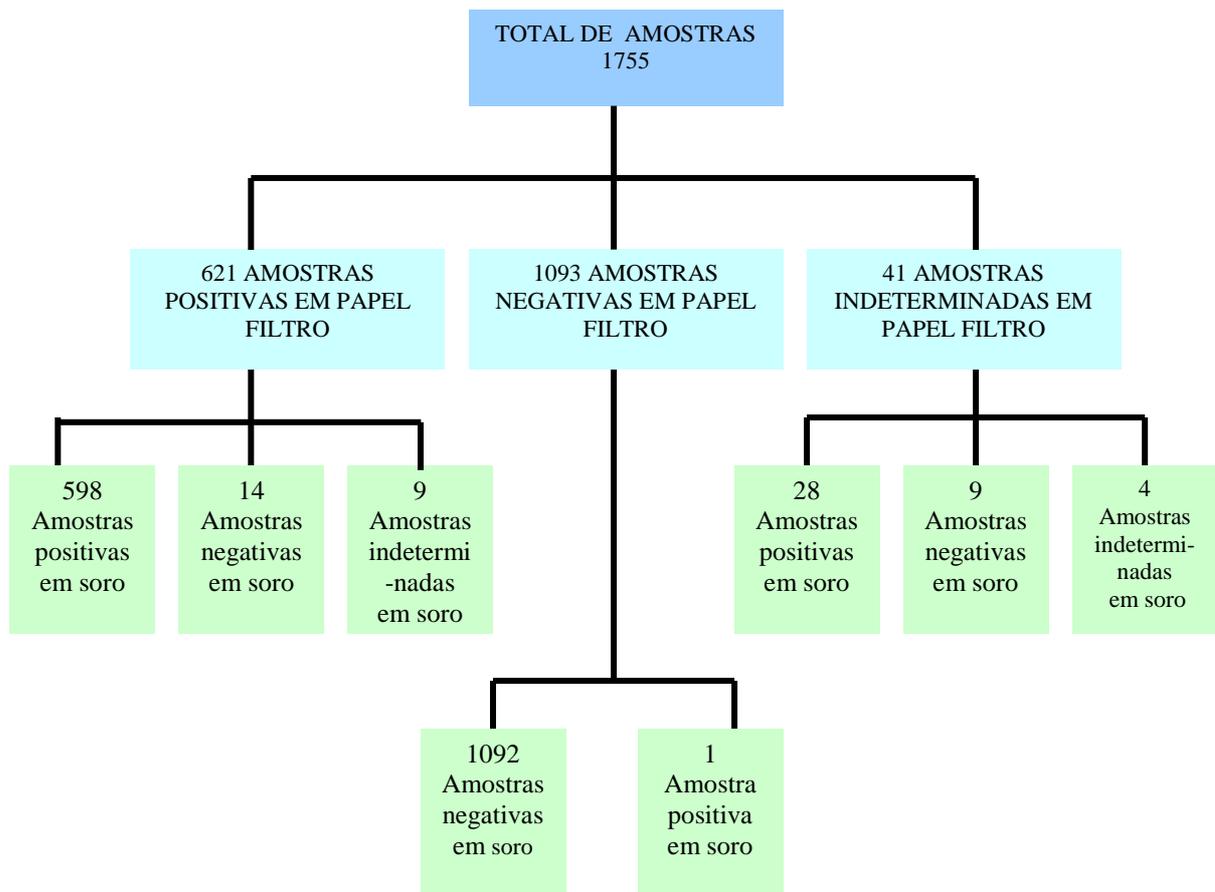


Figura 3: Resultados Finais

Do total de 621 amostras positivas para Toxoplasmose IgM em papel filtro, quando realizadas em soro 598 continuaram positivas (96,3%), 14 amostras negativaram (2,3%) e 9 amostras obtiveram resultados indeterminados (1,4%).

Das 1093 amostras negativas para Toxoplasmose IgM em papel filtro, quando realizadas em soro 1092 continuaram com resultados negativos (99,9%) e somente 1 amostra obteve resultado positivo (0,1%).

Do total de 41 amostras indeterminadas para Toxoplasmose IgM em papel filtro, quando realizadas em soro, 28 amostras obtiveram resultado positivo (68,3%), 9 amostras

negativaram (21,9%) e somente 4 (9,8%) amostras continuaram com resultados indeterminados.

A Sensibilidade para Toxoplasmose IgM em Papel Filtro foi de 99,83%, enquanto que em soro a sensibilidade determinada pelo fabricante é de 97,99, dado este explicado pela característica da técnica de triagem. Em estudo semelhante em gestantes de Mato Grosso do Sul encontrou-se uma sensibilidade para pesquisa de Toxoplasmose IgM de 99,4 % em papel filtro [12].

Não encontramos nenhum estudo semelhante para realizarmos comparações, porém o uso do papel filtro, a sua sensibilidade e especificidade estão sendo objetos de vários estudos com um gama diversificada de dosagens bioquímicas [29], marcadores tumorais e imunológicos [10,20, 24] e dosagens hormonais [9].

Na literatura encontramos, em um estudo realizado na África, uma sensibilidade de até 99% para pesquisa de anti-HIV [30].

A Especificidade para o exame de Toxoplasmose IgM em Papel Filtro foi de 98,73%, enquanto que em soro a especificidade determinada pelo fabricante é de 99,8%. Em outro estudo semelhante foi encontrada uma especificidade de 99,8% para papel filtro [12]. Este fato, provavelmente ocorreu devido a determinação do ponto de corte ser diferente. No presente estudo, trabalhamos com um ponto de corte mínimo e único (*cut-off*: 0,350), pois, pretendíamos testar o potencial de triagem deste método, e o citado estudo trabalhou somente com avaliação de resultados de diagnóstico (resultados finais).

Uma especificidade de 99% para anti-HIV, foi descrita em estudos realizados na África com crianças [30].

Um estudo comparativo para determinação em soro e em sangue seco para Rubéola IgM, pela técnica de HAI, encontrou uma sensibilidade de 99,4% e uma especificidade de 100 % [26].

Foi identificado a ocorrência de 1 falso negativo em Papel Filtro (0,06%).

Foram identificados a ocorrência de 14 falso positivos em Papel Filtro (0,8%).

Foram identificadas 13 amostras que não conseguimos determinar o seu resultado (0,7%).

O Índice *Kappa* encontrado foi de 0,98 (ótima concordância entre soro vs papel filtro).

Para um teste de triagem devemos aumentar a sensibilidade, em consequência ocorre uma diminuição da especificidade, fato este observado em nosso estudo. Porém devemos

salientar que esta diminuição da especificidade não é desfavorável, pois uma única amostra positiva em ELISA (para qualquer determinação), não determina diagnóstico.

As amostras identificadas como indeterminadas, poderão servir de estudo em outra oportunidade, pois necessitariam de uma nova coleta, objetivo que este estudo não determinou. Contudo, nas 13 amostras com resultados discordantes, foi realizado o Teste de Avidéz para Toxoplasmose IgG e todas obtiveram resultado acima de 60% (alta avidéz). Estas pacientes foram acompanhadas e orientadas.

A concordância entre os dois (soro vs papel filtro) métodos foi de 99,12%.

A avaliação de Controle de Qualidade em determinações de laboratório foram introduzidas no Brasil na década de 70-80, através do Programa Nacional de Controle da Qualidade (PNCQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) e do Programa de Excelência em Laboratórios Clínicos (PELM) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, estes dois programas estabelecem limites aceitáveis de erro (LAE) ou limites de controle (LC) para cada analito, estabelecendo assim resultados aceitáveis e não aceitáveis[21].

Os sistemas de controle de qualidade interno mais usados em laboratórios clínicos, atualmente, são o Sistema de Controle de *Levey-Jennings* e o Sistema de Controle através das Regras *Westgard*, ambos estabelecem como limites aceitáveis de variação da análise até +/- 2 desvios padrões [21].

Foram realizadas 16 dosagens de 2 amostras, uma negativa e outra positiva para Toxoplasmose IgM, no intervalo de trinta dias para verificação da estabilidade da amostra, onde observamos os seguintes resultados de acordo com a tabela 2.

Observamos uma média de absorbância de 0,84 para a amostra positiva com um desvio-padrão de 0,11. Conforme determinação da SBAC e SBPC baseados no controle interno de Qualidade de *Levey-Jennings* e *Westgard*, a variação de leitura de absorbância pode ter uma variação de +/- 2 desvios-padrões, ou seja a leitura poderia variar de 0,61 ate 1,07.

Para a amostra negativa, observamos uma média de absorbância de 0,10, com um desvio padrão de 0,04, sendo a variação aceitável de +/- 2 desvios padrões, variando entre 0,02 e 0,18.

Tabela 2: Leituras de Absorbância dos controles

Data	Toxo IgM (+)	Toxo IgM (-)
Abs inicial	1,085	0,157
3/1/2008	1,026	0,081
7/1/2008	1,04	0,072
11/1/2008	0,712	0,066
14/1/2008	0,946	0,098
16/1/2008	0,744	0,06
17/1/2008	0,7	0,052
18/1/2008	0,951	0,071
21/1/2008	0,945	0,056
22/1/2008	0,721	0,131
23/1/2008	0,725	0,158
24/1/2008	0,745	0,134
28/1/2008	0,789	0,125
29/1/2008	0,791	0,156
30/1/2008	0,812	0,161
31/1/2008	0,854	0,131

Em estudo realizado para a determinação bioquímica de triglicérides em sangue seco, observou-se uma estabilidade da amostra de um mês quando armazenada a temperatura ambiente e de 4 meses quando armazenada a 4 graus C. Foi encontrada uma correlação de 0,96 (96%) entre a determinação em soro e sangue seco [29].

Para confirmarmos a Reprodutibilidade do exame em Papel Filtro, repetimos uma mesma amostra negativa por 10 vezes num mesmo ensaio e obtivemos uma media de absorbância de 0,075, e a variação foi de 0,030 até 0,120.

Em estudo realizado em Copenhagen, Dinamarca [32], com marcadores inflamatórios, verificou-se que o uso do papel filtro (sangue seco), seria a escolha para locais onde não existem boas condições de armazenamento e separação de amostras, pois a variação ocorrida nas determinações em papel filtro, foram menores que as variações apresentadas nas determinações em soro e plasma quando armazenadas em diferentes condições. Quando o papel filtro foi armazenado imediatamente após a coleta a 4°C, suas dosagens aproximaram-se dos resultados obtidos em soro quando congelados e separados imediatamente após a coleta, mostrando que se resfriarmos a amostra em papel filtro o seu resultado é potencializado. O citado estudo conclui que os resultados em papel filtro são superiores quando comparados ao

soro e plasma onde não existem instalações disponíveis para o tratamento de amostras líquidas.

O Instituto Adolfo Lutz (IAL), realizou em 2004 uma pesquisa sobre a capacidade de absorção e distribuição de sangue total em diferentes tipos de papel filtro (Whatman nº 1, Nalgon 80g, Nalgon 3550, Nalgon 3551, Nalgon 3552, Macherey-Nagel 640d, Macherey-Nagel 640m, Macherey-Nagel 640w, Macherey-Nagel 640we, Melitta, Jovita, Extra e JProLab 42), segundo o IAL apesar de alguns papéis apresentarem similaridade de absorção, maiores estudos seriam necessários para avaliar a qualidade dos resultados dos exames realizados por diferentes técnicas imunológicas, com o emprego das diferentes especificações de papel filtro, para que se observe a existência ou não de fatores de interferência [15].

Porém, o IAL não testou o papel mais usado para determinações sorológicas e o de escolha para o Teste do Pezinho e também o utilizado nesta pesquisa e por vários pesquisadores, onde foi observado que a capacidade de absorção e distribuição do papel filtro foi suficiente para as determinações propostas.

Em nosso estudo para verificarmos a capacidade de absorção e distribuição de sangue total no papel filtro S&S903, foram realizadas 12 dosagens de uma mesma amostra, porém picotadas em diferentes locais do papel filtro. O material em análise possui 6 circunferências contendo material biológico do qual foram extraídas 2 amostras de cada circunferência e realizada dosagens das mesmas. Não foram encontradas divergência nos resultados entre as 12 determinações.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos para este estudo, os resultados obtidos nos permitem concluir que:

Objetivo 1: Verificar a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos em papel filtro.

De acordo com a técnica padrão (soro), foi identificado a ocorrência de 1 Falso-negativo e 14 falso-positivos em sangue seco.

Objetivo 2: Verificar a especificidade de resultados em papel filtro.

A especificidade do exame em papel filtro foi de 98,73%.

Objetivo 3: Verificar a sensibilidade dos resultados em papel filtro.

A sensibilidade do exame em papel filtro foi de 99,83%.

Objetivo 4: Verificar a concordância de resultados entre os dois métodos.

A concordância entre os dois métodos foi de 99,12%. O Índice *Kappa* encontrado foi de 0,98 (ótima concordância).

Diante do acima exposto podemos concluir que: A pesquisa de Toxoplasmose IgM em papel filtro pode ser usada para triagem de populações, pois mostrou-se que é uma técnica confiável com alta sensibilidade e boa especificidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDRADE, A.L.S.S.; ZICKER, F. **Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis**. Brasília : Organização Pan-Americana de Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 1997.
- [2] ANDRADE, G.M.Q.; CARVALHO, A.L.; CARVALHO, I.R. *et al.* Congenital Toxoplasmosis: treatment and prevention Guideline. **Rev. Med Minas Gerais**. 2004, p. 85-91.
- [3] BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília-DF: MS, 1998.
- [4] CANTOS, G.A.; PRANDO, M.D.; SIQUEIRA, M.V. *et al.* Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos antitoxoplasma gondii e diagnóstico. **Rev Assoc Med Bras**. 2000, p. 335-41.
- [5] CASTILHO-PELOSSO, M.P., FALAVIGNA, Dina Lucia Moraes; ARAÚJO, Silvana Marques de. *et al.* Monitoramento de gestantes com toxoplasmose em serviços públicos de saúde. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop**. 2005, p. 532-3.
- [6] CIMERMAM, B.; CIMERMAM, S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Atheneu, 2000.
- [7] DETANICO, L.; BASSO, R.M.C. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. **RBAC**. 2006, p. 15-8.
- [8] DINIZ, E.M.A.; CAMARGO, M.E.; COSTA VAZ, F.A. **Toxoplasmose congênita**. São Paulo: Atheneu, 1991, p.31-72.
- [9] EDELMAN, Alison; STOUFFER Richard; ZAVA, David T.; JENSEN, Jeffrey. A comparison of blood spot versus plasma analysis of gonadotropin and ovarian steroid hormone levels in reproductive age women. **Fertil Steril**. 2007, 1404-7.
- [10] FERRAZ, A.S.; BELO, E.F.; COUTINHO, L.M. *et al.* Storage and stability of IgG and IgM monoclonal antibodies dried on filter paper and utility in Neisseria meningitidis serotyping by Dot-blot ELISA. **BMC Infectious Diseases**. 2008.
- [11] FIGUEIRÓ-FILHO Ernesto Antonio; LOPES, Alessandro Henrique Antunes, SELEFONTE, Flavio Renato de Almeida *et al.* Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro Oeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2005, p. 442-9.
- [12] _____. Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas' disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**. 2007, p. 181-7.
- [13] FOULON, W; VILLENA, I., STREY-PEDERSEN, B. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: A multicenter study of impact of fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. **Am J Obstetric Gynecol**. 1999, P. 410-5.

- [14] FRANKE, J.K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitol Today**. 1988, p. 273-8.
- [15] GOMES, Aparecida Helena S.; ARINE, Maria de Lourdes B; SZAROTA, Rosa Maria; LANGER, Mayra David. Evaluation of the efficacy of total blood sample absorption and the blood smear diffusion on different types of filter paper. **Rev. do Instituto Adolfo Lutz**. 2004, p. 262-8.
- [16] GUTHRIE Robert; SUSI, Ada. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**. 1963, p. 338-43.
- [17] HANNON W.H.; HENDERSON, L. O.; BELL, C. J. Newborn screening quality assurance. **Genetics and Public Health in the 21st Century: Using Genetic Information to Improve Health and Prevent Disease**. 2000, p. 243-58.
- [18] JONES, J.L, LOPEZ, A.; WILSON, M. et al. Congenital toxoplasmosis. **A Review. Obstetrical and Gynecological Survey**. 2001, p. 296-305.
- [19] KOMPALIC-CRISTO, A; BRITTO *et al.* Diagnóstico molecular da toxoplasmose: Revisão. **J Bras. Patol. Med. Lab**. 2005, p. 229-35.
- [20] KOUANDA, S. *et al.* **Reference values of IGF-I in children from birth to 5 years of age, in Burkina Faso, using blood samples on filter paper**. Elsevier, 2008.
- [21] LOPES, H.J.J. Garantia e controle da qualidade no laboratório clínico. Assessoria técnico-científica da Gold Analisa Diagnóstico Ltda. Disponível em: http://www.goldanalisa.com.br/publicacoes/Grantia_e_Controlo_da_Qualidade_no_Laboratorio_Clinico.pdf. Acesso em: 17 mar. 2008.
- [22] MARGONATO, Fabiana Burdini; SILVA, Ana Mario Rigo; SOARES, Darli Antonio *et al.* Toxoplasmose na gestação: diagnóstico, tratamento e importância de protocolo clínico. **Rev. Bras. Saúde Mater. Infant**. dez., 1997, 7(4): 381-386.
- [23] MEI, Joanne V.; ALEXANDER, J. Richard; ADAM, Barbara W.; HANNON, W. Harry.. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. **The Journal of Nutrition**, 2001, p. 1631-6.
- [24] PARKER, S.P. *et al.* Use of dried blood spots for the detection and confirmation of HTLV-I specific antibodies for epidemiologic purposes. **J Clin Pathol**. 1995, 904-7.
- [25] PARKER, S.P., CUBITT, W.D. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. **J Clin Pathol**. 2006, p. 633-9.
- [26] PUNNARUGSA V.; MUNGMEE, V. Detection of rubella virus immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies in whole blood on Whatman paper: comparison with detection in sera. **J Clin Microbiol**. 1991, p. 2209-12
- [27] RAVEL, R. **Aplicações clínicas de dados laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro, 1998.
- [28] REMINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; THULLIES, P.; DESMONTS, G. **Infectious diseases of the fetus & newborn infant**. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders 2001.

- [29] RIZWANA Quraishi *et al.* Use of filter paper stored dried blood for measurement of triglycerides. **Lipids in Health and Disease**. 2006, p.120-3.
- [30] SARGE-NJIE, Ramu; LOEFF, Maarten Schim Van Der; CEESAY, Saihou *et al.* Evaluation of the dried blood spot filter paper technology and five testing strategies of HIV-1 and HIV-2 infections in West Africa Scandinavian. **Journal of Infectious Diseases**. 2006, p. 1050-6.
- [31] SHARMA, S.D. **Imunology of toxoplasmosis**. New York: WD Freeman, 1990.
- [32] SKOGSTRAND Kristin *et al.* Effects of blood sample handling procedures on measurable inflammatory markers in plasma, serum and dried blood spot samples. **Journal of Immunological Methods**. 2008, p. 78-84.
- [33] SPALDING, S.M; AMENDOEIRA, Maria Regina R.; RIBEIRO, Luis Carlos *et al.* Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2003, p. 483-91.
- [34] VERONESI, R. Tratado de infectologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

ANEXOS

ANEXO A

	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO	
	Procedimento Operacional Padrão	POP Nº 13
	COLETA	Pág: 32-33

01 – OBJETIVO:

Estabelecer as instruções pormenorizadas para coleta de material e manuseio do mesmo, de modo a possibilitar uma coleta dentro das normas internacionais e com qualidade necessária para obtenção de amostras específicas para os exames.

02 – MATERIAL:

- Lanceta estéril com ponta de aproximadamente 2,0 mm;
- Álcool preparado estéril;
- Algodão;
- Gaze estéril;
- Seringas (5,0 ml);
- Agulha (0,70x25);
- Formulário para coleta de sangue (papel filtro);
- Tubos de vidro (tampa vermelha ou roxa);
- Luvas.

03 – PROCEDIMENTO:

***Coleta em papel filtro (primeira e segunda amostra):

-Preencher todos os campos destinados às informações da paciente com letra legível. Para evitar a contaminação dos círculos do papel filtro, não permita que os mesmos entrem em contato com fluidos e não os toque antes ou depois da coleta de sangue.

-Guarde a “controle do paciente”, e solicite a assinatura da paciente na autorização no verso.

-Limpe o local com álcool secando completamente.

-Faça uma punção no dedo anelar da mão esquerda.

-Encoste levemente o papel-filtro na gota grande de sangue. Espere até que o sangue seja absorvido e preencha completamente o círculo com aplicação de uma única gota de sangue (para aumentar o fluxo de sangue, mantenha uma pressão suave e intermitente na área próxima ao local da punção). Aplique o sangue somente em um lado do papel.

-Preencha os filtros restantes da mesma forma como descrito anteriormente, com gotas de sangue sucessivas.

-Pode ser usado sangue coletado em via venosa por seringa e distribuído posteriormente no papel filtro para secagem.

-Após a coleta, a amostra deve secar por 04 (quatro) horas no suporte em temperatura ambiente. Após este período, deverá ser enviado o mais rápido possível para agilizar a

assistência à gestante, contudo, se for necessário, essa amostra pode permanecer coletada, aproximadamente, por 10 (dez) dias.

*****Recoletas:**

Procedimento para confirmação de exames alterados ou duvidosos:

Será comunicado e orientado por meio de serviço social do IDP-APAE de Goiânia. Na capital, o IDP APAE irá levar e recolher o material para coleta (tubos) por meio de mensageiros, porém, nos interiores, o material (tubos) será enviado via correio, acompanhado de uma solicitação de coleta orientando o tipo de amostra desejada (soro ou sangue total); o técnico da unidade de saúde irá colher 5,0 ml de sangue em cada tubo, acondicionar no recipiente (caixa de isopor) e remeter via correio para o IDP (Instituição de Diagnóstico e Prevenção) da APAE de Goiânia.

OBS: Os técnicos envolvidos fazem uso dos EPI's.

	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO	
	Procedimento Operacional Padrão	POP Nº 14
	RECEPÇÃO DE AMOSTRAS	Pág: 34-36

01 – OBJETIVO:

Receber e organizar as amostras enviadas ao IDP-APAE-Goiânia.

02 – AMOSTRAS DE PRIMEIRA FASE:

As amostras passam por diversas etapas até estarem prontas para a realização dos exames, nas quais são feitas algumas verificações:

***Nome do posto de Coleta e Cidade de origem.**

-Observar se campo “Posto de Coleta” está devidamente preenchido; em caso de inexistência do nome do posto ou posto de coleta não cadastrado, entrar em contato a SMS do Município para confirmação.

-O nome da cidade onde foi feita a coleta, deve ser escrito no rodapé da ficha pelo responsável da verificação como confirmação.

***Observar a data e aspecto da amostra.**

-Amostra com trinta (30) dias ou mais é considerada inapta, sendo necessária solicitação da coleta de uma nova amostra pelo posto de origem.

-Amostras de coloração escura e/ou de aparência seca são separadas para testes (verificação de eluição), em caso de amostra reprovada é solicitado ao posto que providencie uma nova amostra.

-A amostra deve possuir quantidade suficiente de sangue para retirada de 14 picotes, caso quantidade insuficiente, é solicitado ao posto que providencie uma nova amostra.

***Codificação.**

-As amostras que estiverem aptas a dar continuidade ao processo são etiquetadas com código interno seqüencial (duas etiquetas: 1.Parte do cartão que será destacada posteriormente contendo a amostra, 2.Parte do cartão contendo os dados do paciente).

-Destacar a parte do cartão contendo a amostra (devidamente etiquetada).

***Organização dos lotes:**

-Estando as fichas (dados do paciente) já codificadas e separadas da parte do cartão contendo a amostra, organiza-las em lotes.

-Cada lote possui 376 fichas (pacientes). Depois de finalizado, o lote é entregue no setor de CPD para sua inclusão no sistema do IDP-APAE-Goiânia.

-Com as amostras de sangue não é diferente, também são organizadas em lotes. No entanto cada lote é subdividido em quatro blocos contendo 94 amostras. Cada bloco é referente a uma placa de ELISA.

-O lote é entregue ao responsável do Picote.

-Depois de picotadas são armazenadas entre 2-8°C por tempo indeterminado.

03 – AMOSTRAS DE SEGUNDA FASE:

As amostras passam por diversas etapas até estarem prontas para a realização dos exames, nas quais são feitas algumas verificações:

***Nome do posto de Coleta e Cidade de origem.**

-Observar se campo “Posto de Coleta” está devidamente preenchido; em caso de inexistência do nome do posto ou posto de coleta não cadastrado, entrar em contato a SMS do Município para confirmação.

***Observar a data e aspecto da amostra.**

-Amostra com trinta (30) dias ou mais é considerada inapta, sendo necessária solicitação da coleta de uma nova amostra pelo posto de origem.

-Amostras de coloração escura e/ou de aparência seca são separadas para testes (verificação de eluição), em caso de amostra reprovada é solicitado ao posto que providencie uma nova amostra.

-A amostra deve possuir quantidade suficiente de sangue para retirada de 2 picotes, caso quantidade insuficiente, é solicitado ao posto que providencie uma nova amostra.

***Codificação.**

-As amostras que estiverem aptas a dar continuidade ao processo devem ser codificadas.

-O código dado deve ser o mesmo utilizado na primeira fase.

-A pesquisa desse código é feita através do programa Prmain.

1. Entra no programa;

2. Clicar em apoio;

3. Pode ser utilizado → Pesquisa por nome: Onde se digita o nome da paciente preenchido na ficha e em associação a data de nascimento → Clicar pesquisa.

4. Pode ser utilizado também → Pesquisa por código: Onde se digita o SIS da paciente → Clicar pesquisa.

5. As associações (nome/data de nascimento/SIS) são feitas para eliminar qualquer possibilidade de codificação incorreta.

-Confirmado nome preenchido na ficha com código da primeira amostra (se tratando da mesma paciente), anotar o código encontrado (tanto na parte da ficha que contém a amostra quanto na parte dos dados da mesma).

***Organização dos lotes.**

-Com as fichas já codificadas são organizadas em ordem crescente (de acordo com o código).

-Destacar a parte do cartão contendo os dados da paciente da parte contendo amostra (devidamente codificado).

-Organizar em lotes. Cada lote possui 188 fichas (pacientes).

- Depois de finalizado, o lote é entregue no setor de CPD para sua inclusão no sistema do IDP-APAE-Goiânia.

-Com as amostras de sangue não é diferente, também são organizadas em lotes. No entanto cada lote é subdividido em seis bloquinhos (5 com 30 amostras e 1 com 38 amostras).

-Armazenar entre 2-8°C até o momento de serem processadas.

-Depois de processadas (Ver POP Trigésima) as amostras são armazenadas entre 2-8°C por tempo indeterminado.

	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO	
	Procedimento Operacional Padrão	POP Nº 15
	VERIFICAÇÃO DE AMOSTRAS	Pág: 37-39

01 – OBJETIVO:

Avaliar todas as amostras enviadas, segregando as inaptas para solicitação de uma nova coleta.

02 – CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO:

-Amostra válida: Permita que uma quantidade suficiente de sangue seja absorvida, até preencher completamente o círculo impresso no papel-filtro. Preencha todos os círculos requeridos com sangue. Não aplique camadas sucessivas de gotas de sangue, nem aplique sangue mais de uma vez no mesmo círculo coletor. Evite tocar ou esfregar as amostras.



-Amostra inválida – Quantidade insuficiente de amostra para teste:

O papel filtro foi removido antes que o sangue tivesse preenchido completamente o círculo, ou antes, de que o sangue tivesse absorvido pela segunda face.

O sangue foi aplicado no filtro com um tubo capilar.

O filtro foi tocado antes ou depois da coleta da amostragem com luvas ou sem luvas, com as mãos untadas de loção para as mãos, etc.

O papel filtro entrou em contato com mãos com ou sem luvas, ou com substâncias tais como loção para as mãos ou talco antes ou depois da coleta da amostra de sangue.



-Amostra inválida – A amostra parece raspada ou arranhada:

O sangue foi aplicado com tubo capilar ou outro dispositivo.



-Amostra inválida – A amostra não estava seca quando enviada:

A amostra foi enviada antes de um período de secagem de 04 (quatro) horas.



-Amostra inválida – A amostra tem aparência supersaturada:

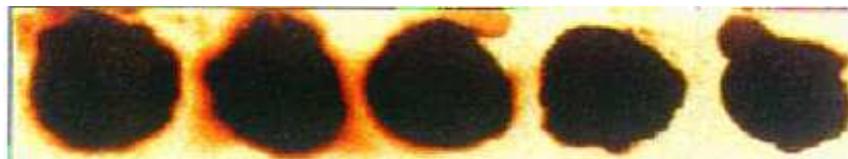
Sangue em excesso foi aplicado no papel-filtro, possivelmente com um dispositivo. O sangue foi aplicado em ambos os lados do papel filtro.



-Amostra inválida – A amostra parece diluída, descorada ou contaminada:

O papel filtro entrou em contato com mãos usando luvas ou não, ou substâncias tais como álcool, produtos químicos, soluções anti-sépticas, água, loção para as mãos, etc., antes ou depois da coleta de sangue para a amostra.

-As amostras de sangue foram expostas ao calor direto.



-Amostra inválida – A amostra apresenta anéis de soro:

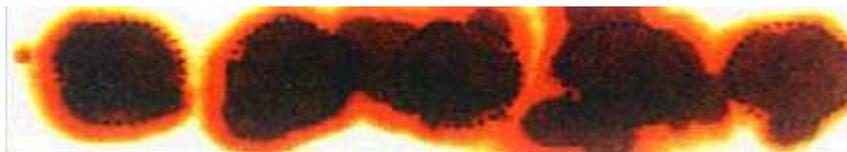
O álcool passado no local da punção não foi seco antes da punção ser realizada.

O papel filtro entrou em contato com o álcool, loção para mãos, etc.

A área ao redor da punção foi espremida excessivamente.

Secagem inadequada da amostra.

O sangue foi aplicado com tubo capilar.



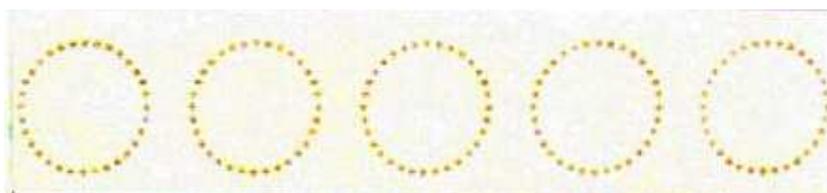
-Amostra inválida – A amostra parece coagulada ou em camadas:

Tocar com sangue várias vezes o mesmo círculo no papel filtro.
Preencher o círculo de ambos os lados do papel filtro.



-Amostra inválida – Não há sangue:

Não foi obtida nenhuma amostra de sangue.



03 – AMOSTRAS INAPTAS:

As amostras consideradas inaptas após a verificação visual são separadas e testadas quanto à eluição.

Uma vez confirmada a não eluição são encaminhadas ao serviço social do IDP- APAE de Goiânia responsável em solicitar uma nova amostra.

Existe um controle interno de amostras inaptas: Nome da paciente, motivo da solicitação de nova coleta e data da solicitação.

As amostras consideradas inaptas ainda são armazenadas por um período para verificações futuras (geladeira nº03).

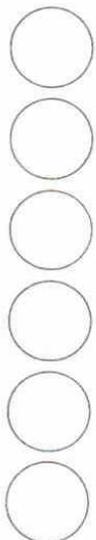
CARTÃO DE COLETA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Fui devidamente esclarecida da importância de saber dos resultados dos meus exames e/ou do benefício de iniciar ou dar continuidade do tratamento prescrito. Caso qualquer uma das patologias triadas (inclusive HIV), tenham resultado alterado, autorizo que seja feito a busca ativa com visita domiciliar, por telefone ou qualquer outro meio de comunicação necessária para confirmação e acompanhamento, e também do recém nascido após o parto.

Autorizo a Realização dos Exames do Programa de Proteção à Gestante de GO(Inclusive HIV)

Assinatura.....RG.....



BEBE - LDT - B030310303 B03B

GESTANTE

Nº

Nº



ÁREA DE GOIÂNIA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO

RUA 34, QD. A-23, LT. 18 E 19 - CEP 74805-370 - JD. GOIÁS
FONE/FAX: (62) 3238-7000 - GOIÂNIA - GO

PROGRAMA DE PROTEÇÃO À GESTANTE DO ESTADO DE GOIÁS

PACIENTE / GEST.													
ENDEREÇO										DATA DE NASCIMENTO			
CIDADE								ESTADO		ÚLTIMA MENSTRUÇÃO			
BAIRRO				CEP				TELEFONE					
POSTO DE COLETA													
Nº DO CARTÃO DO SUS				SIS PRÉ NATAL				Nº DE GESTAÇÕES		ABORTOS		QUANT.	
COLETADOR(A)				COR DA GESTANTE		PARTO NORMAL		TEMPO DE GESTAÇÃO		EM SEMANAS			
				<input type="checkbox"/> BRANCA	<input type="checkbox"/> PARDA	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO						
				<input type="checkbox"/> PRETA	<input type="checkbox"/> AMARELA	<input type="checkbox"/> CESARIANA							

OBS: ESTE CARTÃO DEVE CONTER OS DADOS ACIMA SOLICITADOS PREENCHIDOS COM LETRA DE FORMA LEGÍVEL, PARA EVITAR DEVOLUÇÕES.



APAE - ASSOCIAÇÃO DE PAIS E AMIGOS DOS EXCEPCIONAIS DE GOIÂNIA-GO

Complexo I: Rua 255, nº 628 - Setor Coimbra Goiânia-GO CEP: 74533-150.

- Administração - Fone: 3226-8000 Fax: 3226-8001 / Telemarketing - Fone: 3226-8010
- CEATE I - Centro de Atendimento Especializados I - Fone: 3226-8040
- CEESHA - Escola Especial Helana Antipoff - Fone: 3226-8037

Complexo II: Rua 58 nº. 329 esq. c/ Avenida A e Rua 56 - Jardim Goiás - Goiânia-GO CEP: 74.805-020

- CEPAT - Centro Educacional "Prof. Anísio Teixeira" - Fone: 3531-6700
- CEATE II - Centro de Atendimento Especializados II - Fone: 3531-6700
- CCEL - Centro de Cultura Esporte e Lazer Christian & Ralf
- CFFA - Centro de Formação da Família Apeeana - Fone: 3531-6700

Complexo III: Avenida Prof. Alfredo de Castro Qd. R F Lt. 14- nº. 1.075 - Chácara do Governador - Goiânia-GO CEP: 74.870-038

- CEPROLIM - Centro de Profissionalização Especial "Dr. Lincoln Marques da Rocha" - Fone: 3532-6900

IDP - Instituto de Diagnóstico e Prevenção - Fone: 3238-7000 - Fax: 3238-7001

Rua 34, Qd A-23 Lt 18 e 19 nº. 79 - Jardim Goiás - Goiânia- Goiás - CEP: 74.805-370.

► www.apaedegoiania.org.br ► contato@apaedegoiania.org.br

REG. CNAB - MEC Nº. 229.317/73 - CNPJ: 01.240.688/0001 - 40. - REG. Nº. 223 FLS: 22 V.O. E 23 - CARTÓRIO SAMPAIO, NETO - DECRETO- Utilidade Pública Federal - lei nº 50.517, Estadual lei nº. 9.492 e Municipal lei nº. 4.211

Goiânia, 04 de Agosto de 2008.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA

À
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Venho por meio deste, autorizar a realização da pesquisa intitulada "Análise comparativa entre testes de ELISA (Soro) e Papel Filtro (Sangue Seco), para detecção de Toxoplasmose IgM", sob responsabilidade da Biomédica Ana Lucia Mulazzani Minuzzi, CRBM 3-415, portadora do CPF nº 382.940.601-00, Carteira de identidade nº 1.674.566 SSPGO.

A coleta de dados do presente estudo será realizada no IDP – Instituto de Diagnóstico e Prevenção da Apae de Goiânia. Ressalto ainda, que o mesmo oferece as condições necessárias para o desenvolvimento de pesquisa referida acima.

Atenciosamente,

Emilia Terezinha Borges
Presidente - APAE de Goiânia

**EFICIÊNCIA DO TESTE COM PAPEL FILTRO (SANGUE SECO) NA DETECÇÃO
DE TOXOPLASMOSE IgM.**

**Efficiency of the filter-paper test (Dried blood spots) in detection of *Toxoplasma gondii*-
specific IgM**

Ana Lucia Mulazzani Minuzzi^{1,2}; Carlos Tomaz²

¹Instituto de Diagnóstico e Prevenção da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de
Goiânia – GO

²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade de Brasília, DF

Endereço para correspondência:

Ana Lucia Mulazzani Minuzzi

Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Goiânia

Rua 34, Qd: A23, Lts: 18 e 19, Jardim Goiás , Goiânia – GO

74805-370

Fone: (62) 3238 7000

Fax: (62) 3238 7001

anaminuzzi@gmail.com

RESUMO

O sangue seco (papel filtro), é um meio barato de coleta e armazenamento de amostras, uma vez que são estáveis e não infectantes. A Toxoplasmose é uma doença infecciosa, que requer especial atenção em gestantes e pacientes imunodeprimidos. Foi realizado um estudo comparativo entre soro (técnica padrão) e papel filtro com 1755 amostras para determinação de Toxoplasmose IgM. A concordância entre os dois métodos foi de 99,12 %, o Índice *Kappa* encontrado foi de 0,98 e a sensibilidade do papel filtro foi de 99,83%. Esses resultados demonstram o excelente potencial da pesquisa de Toxoplasmose IgM em papel filtro para triagem de populações.

Palavras-chave: Papel filtro, transmissão vertical, toxoplasmose congênita, toxoplasmose

ABSTRACT

Filter-paper is a convenient and inexpensive media to collect and store blood-spot samples. Blood spots on paper are stable and minimize the risk of individual infection due to sample handling. Toxoplasmosis is an infectious disease which requires special attention during pregnancy and in immunodepressed patients. The current study investigated comparatively the seroprevalence for *T. gondii*-specific IgM in 1755 biological samples from pregnant women using both the conventional and filter-paper immunofluorometric detection methods. The two methods were able to detect the *T. gondii*-specific IgM (concordance value = 99,12 % and *Kappa* = 0,98) and the filter-paper assay sensibility was 99,83%. The concordance, specificity, and reproducibility of the two assays make the filter-paper test a convenient population screening method for congenital toxoplasmosis.

Key-words: Filter-paper, vertical transmission, congenital toxoplasmosis, toxoplasmosis

INTRODUÇÃO

O sangue seco (papel filtro) aparece como uma alternativa para substituição da coleta de soro, plasma ou sangue total em países com recursos limitados e em regiões de difícil acesso, pois, a sua coleta é facilitada e não requer refrigeração para o seu transporte.

O uso do papel filtro em exames laboratoriais tornou-se difundido no Brasil, na década de 80, com a obrigatoriedade da realização do “Teste do pezinho”. Vários estudos estão sendo realizados em papel filtro para determinações bioquímicas, marcadores tumorais, imunológicos, hormônios e pesquisa de anticorpos, destacando-se a pesquisa de Anti-HIV na

África, pois, esta é uma excelente alternativa para países com escassos recursos econômicos, longas distâncias e de difícil acesso [25,27,30,31,36].

Dentre as vantagens de utilização de amostras em sangue seco, podemos citar a relativa facilidade de coleta, seu baixo custo, transporte, armazenamento, não necessitando de refrigeração e acondicionamentos especiais. A amostra pode ser transportada dentro de um envelope simples, somente com o símbolo de material biológico infectante [22].

A Toxoplasmose é uma doença infecciosa, congênita ou adquirida, causada pelo *Toxoplasma gondii*, que requer especial atenção em gestantes por ser uma doença de alta prevalência e que pode ser transmitida ao feto, mas que se mantém assintomática na grande maioria dos casos [17]. A infecção transplacentária ocorre em 40% dos fetos de mães que adquiriram a infecção durante a gravidez [18]. A incidência de Toxoplasmose aguda na gravidez varia de 0,06% a 1,4%, onde aproximadamente 15% das infecções resultam em morte intra-uterina e dos 85% que nascem, cerca de 80% desenvolvem manifestações tardias [18].

Assim, fica evidente a conveniência de estabelecer com precocidade o diagnóstico, principalmente porque o tratamento bem instituído é confiável e tende a prevenir problemas futuros [23]. A importância de estabelecer o perfil sorológico da gestante reside na possibilidade de adoção de medidas profiláticas e terapêuticas para minimizar a transmissão vertical e ocorrência de danos ao desenvolvimento fetal [8].

O diagnóstico da infecção materna é realizado identificando a fase aguda da doença, onde existe positividade tanto para anticorpos IgM, quanto para IgG. O diagnóstico laboratorial constitui um desafio para os profissionais de saúde envolvidos na assistência à gestante e ao conceito com suspeita de infecção pelo *Toxoplasma gondii*. Além da complexidade de interpretação de marcadores de fase aguda, as modernas técnicas laboratoriais nem sempre estão disponíveis nos serviços de saúde pública [8]. Vários tipos de provas sorológicas são atualmente utilizados para possibilitar o diagnóstico da Toxoplasmose e diferenciar suas fases, se aguda ou crônica. O diagnóstico laboratorial da Toxoplasmose tem se baseado, principalmente, na pesquisa de anticorpos contra o parasito. Em indivíduos imunocompetentes os testes sorológicos com pesquisa de IgG e IgM são suficientes para o diagnóstico, por serem sensíveis, específicos e de fácil execução [29]. Os testes de Hemaglutinação Indireta, embora ainda utilizados, apresentam limitações, pois podem levar a falsos resultados e também não diferenciam doença aguda de crônica [35]. A Imunofluorescência Indireta (IFI) é o melhor, mais sensível e mais seguro dos métodos diagnósticos, identificando tanto a fase aguda como a fase crônica da doença. Porém, a

pesquisa de IgM por este método tem se mostrado pouco sensível, possivelmente devido à competição com as IgG, levando a resultados falso-negativos [11]. O teste imunoenzimático (ELISA) tem se tornado um dos testes mais usados atualmente, principalmente para triagem de populações específicas. Ao contrário da IFI é um teste objetivo e com leitura automatizada, não dependendo de interpretação humana, passíveis de engano. Os testes de ELISA apresentam maior sensibilidade para pesquisa de anticorpos da classe IgG e a mesma sensibilidade da IFI para pesquisa de anticorpos a classe IgM, porém são mais específicos [36].

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência (sensibilidade e reprodutibilidade) do uso do papel filtro na pesquisa de anti-Toxoplasma IgM pela metodologia de ELISA, tendo em vista que a validade e a reprodutibilidade são fundamentais para avaliar a qualidade de um exame diagnóstico e a informação por ele produzida [40]. Para tanto, foi realizado um estudo comparativo entre a técnica convencional em soro e a técnica em papel filtro (sangue seco), usando kits comerciais registrados no Ministério da Saúde (ANVISA).

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo comparativo com amostras coletadas entre Julho de 2006 a Julho de 2007, provenientes de 1755 gestantes atendidas no PPGGO (Programa de Proteção a Gestante do Estado de Goiás) e encaminhadas para o IDP APAE de Goiânia (Instituto de Diagnóstico e Prevenção da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Goiânia).

O PPGGO realiza a triagem de doenças infecciosas passíveis de transmissão vertical, tais como: HIV, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovirus, Chagas, Hepatites B e C, Sífilis e HTLV I/II.

As amostras foram coletadas em papel filtro Schleicher & Schuell (S&S 903) e eluídas para extração das proteínas e posterior realização dos testes de ELISA. Nos casos com resultados iniciais supostamente positivos ou indeterminados foi realizada uma nova coleta em sangue venoso para confirmação de diagnósticos.

Foram coletadas um total de 1755 amostras, sendo 1093 negativas (62,2%), 621 positivas (33,5%) e 41 indeterminadas (4,3%). As amostras negativas foram provenientes de pacientes que na realização de exames em papel filtro foram presumidamente positivas ou indeterminadas para marcadores de outra patologia (Hepatite B) e confirmadas como

negativas para Toxoplasmose IgM. As amostras positivas ou indeterminadas foram provenientes de pacientes que na triagem em papel filtro obtiveram esses resultados.

Foram colhidas gotas de sangue periférico em papel filtro (seis circunferências), acoplados a uma ficha padronizada de identificação da gestante, contendo no verso consentimento informado para realização dos testes sorológicos.

RESULTADOS

Foram analisadas 1755 amostras em papel filtro, onde inicialmente 621 amostras eram positivas, 1093 eram negativas e 41 eram amostras com resultados indeterminados.

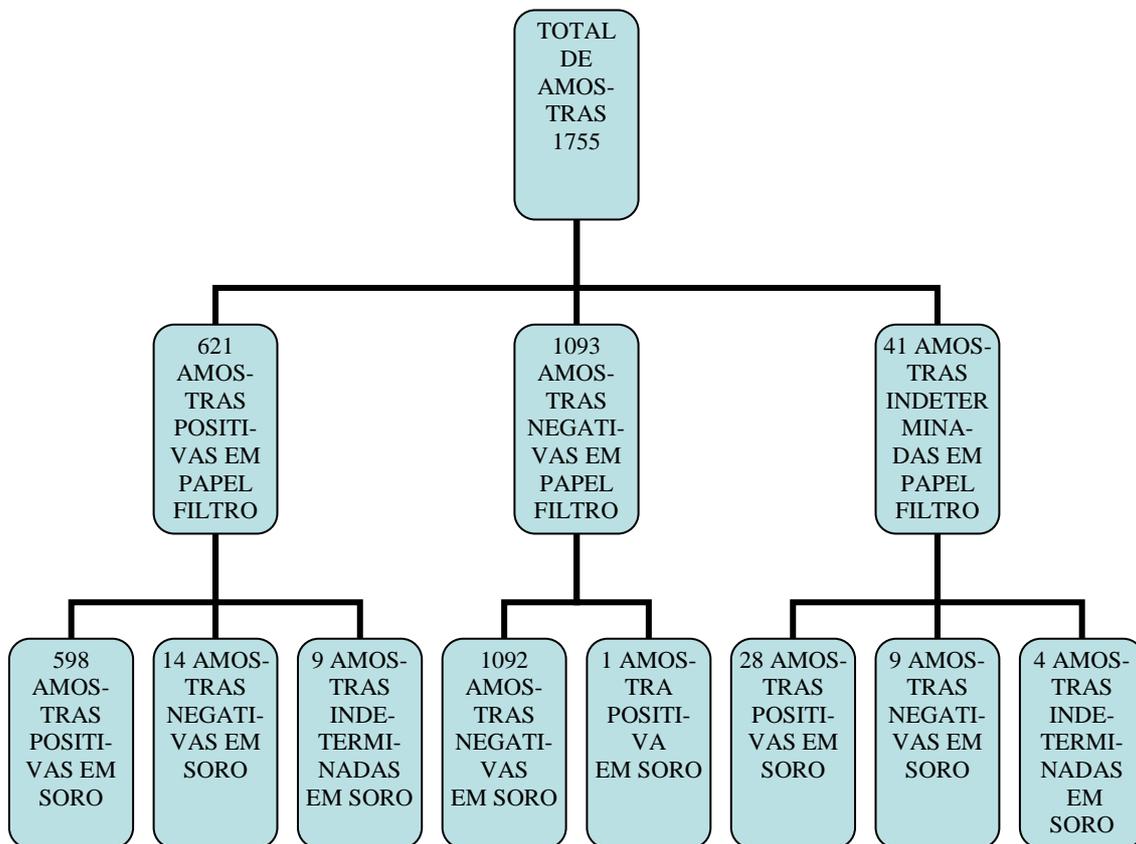


Figura 1: Resultados Finais

Do total de 621 amostras positivas para Toxoplasmose IgM em papel filtro, quando realizados testes em soro, 598 continuaram positivas (96,3%), 14 amostras negativaram (2,3%) e 9 amostras apresentaram resultados indeterminados (1,4%).

Das 1093 amostras negativas para Toxoplasmose IgM em papel filtro, quando testadas em soro, 1092 continuaram com resultados negativos (99,9%) e somente 1 amostra obteve resultado positivo (0,1%).

Do total de 41 amostras indeterminadas para Toxoplasmose IgM em papel filtro, quando testadas em soro, 28 amostras obtiveram resultado positivo (68,3%), 9 amostras negativaram (21,9%) e somente 4 (9,8%) amostras continuaram com resultados indeterminados.

DISCUSSÃO

A Sensibilidade para Toxoplasmose IgM em Papel Filtro foi de 99,83 %, enquanto que em soro a sensibilidade determinada pelo fabricante é de 97,99%, dado este explicado pela característica da técnica de triagem. Em estudo semelhante encontrou-se uma sensibilidade para pesquisa de Toxoplasmose IgM de 99,4 % [16].

A Especificidade para o exame de Toxoplasmose IgM em Papel Filtro foi de 98,73, enquanto que em soro a especificidade mencionada pelo fabricante é de 99,8%. Em outro estudo [16] foi encontrada uma especificidade de 99,8% para papel filtro. Este fato, provavelmente ocorreu devido o ponto de corte ser diferente. No presente estudo, trabalhamos com um ponto de corte mínimo e único (*cut-off*: 0,350), pois, pretendíamos testar o potencial de triagem deste método, e o citado no outro estudo trabalhou somente com avaliação de resultados de diagnóstico (resultados finais).

A concordância entre os dois métodos (soro vs papel filtro) foi de 99,12 %.

Não encontramos nenhum estudo semelhante para fazermos comparações, porém o uso do papel filtro, a sua sensibilidade e especificidade estão sendo objetos de vários estudos com um gama diversificada de dosagens bioquímicas [30], marcadores tumorais, imunológicos e dosagens hormonais [31, 27].

Na literatura, encontramos em um estudo realizado na África, uma sensibilidade de até 99% para pesquisa de anti-HIV [36].

Um estudo comparativo para determinação em soro e em sangue seco para Rubéola IgM, pela técnica de HAI, encontrou uma sensibilidade de 99,4% e uma especificidade de 100 % [28].

Para um teste de triagem devemos aumentar a sensibilidade, em consequência ocorre uma diminuição da especificidade, fato este observado em nosso estudo. Porém devemos

salientar que esta diminuição da especificidade não é desfavorável, pois uma única amostra positiva em ELISA não determina diagnóstico.

Foram realizadas 16 dosagens de 2 amostras, uma negativa e outra positiva para Toxoplasmose IgM, no intervalo de trinta dias para verificação da estabilidade da amostra. Observamos uma média de absorvância de 0,84 para a amostra positiva, com um desvio padrão de 0,11.

Para confirmarmos a Reprodutibilidade do exame em papel filtro, repetimos uma mesma amostra negativa por 10 vezes num mesmo ensaio e obtivemos uma media de absorvância de 0,075, podendo variar de 0,030 ate 0,120.

Em estudo realizado na Dinamarca [25], com marcadores inflamatórios, verificou-se que o uso do papel filtro (sangue seco), seria a escolha para locais onde não existem boas condições de armazenamento e separação de amostras, pois a variação ocorrida nas determinações em papel filtro, foram menores que as variações apresentadas nas determinações em soro e plasma quando armazenadas em diferentes condições.

Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que a pesquisa de Toxoplasmose IgM em papel filtro é um método confiável para triagem de populações específicas, pois, possui uma sensibilidade de 99,83% e uma especificidade de 98,73% .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aline S Ferraz EFB, Ligia MCC Coutinho, Ana P Oliveira, Andréia MS Carmo, Daniele L Franco, Tatiane Ferreira, André Y Yto,, Marta SF Machado MCSaEDG. Storage and stability of IgG and IgM monoclonal antibodies dried on filter paper and utility in Neisseria meningitidis serotyping by
2. Alison Edelman RS, David T Zava, and Jeffrey T. Jensen,. A comparison of blood spot versus plasma analysis of gonadotropin and ovarian steroid hormone levels in reproductive age women. Fertil Steril. 2007:1404-7.
3. Andrade GMQ, Carvalho, A.L.,Carvalho, I.R.,Nogueira, M.G.S.,Orefice, F. . Congenital Toxoplasmosis – Treatment and prevention Guideline. RevMed Minas Gerais. 2004:85-91.
4. Arine MdLB, Gomes, A. H. S., Szarota, R. M., Langer, M. D. Evaluation of the efficacy of total blood sample absorption and the blood smear diffusion on different types of filter paper. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 2004:262-8.

5. Beghetto E, Spadoni, A., Bruno, L., Buffolano, W., Gargano, N. . Chimeric Antigens of *Toxoplasma gondii*: Toward Standardization of Toxoplasmosis Serodiagnosis Using Recombinant Products. *J Clin Microbiol*. 2006:2133-40.
6. Brody JA. Hemagglutination inhibition and neutralization test using whole blood dried on filter paper discs. . *Lancet* ii. 1963:616.
7. Cantos GA, Prando, M.D., Siqueira, M.V. et al. Toxoplasmose: Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma gondii e diagnostico. *Rev Assoc Med Bras*. 2000:335-41.
8. Castilho-Pelosso MP, Falavigna, Dina Lucia Morais, Araujo, Silvana Marques de et al. Monitoramento de gestantes com toxoplasmose em serviços públicos de saúde. *RevSocBrasMedTrop*. 2005:532-3.
9. Cimerman B, Cimerman, S... *Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais*. São Paulo: Editora Atheneu 2000.
10. Cláudia Regina De Marchi VANEICdA. Comportamento do método quimioluminescente-ELISA em relação a resultados considerados discordantes por meio de três técnicas convencionais para diagnóstico da doença de Chagas. *Revista da*
11. Costa, AMM;Bonifácio, AC; Santos, RP; Cordeiro, JCS. Dosagem de IgM anti-toxoplasma por IFI e ELFA em títulos elevados de IgG. *News Lab*, ano VI, nº28, pág.78-81, 1998Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2007:68-70.
12. Cubitt SPaW. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *J Clin Pathol*. 2006:633-9.
13. Detanico L, Basso, RMC. Toxoplasmose: Perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. *RBAC*. 2006:15-8.
14. Dhondt J-L. Neonatal screening: from the Guthrie age_ to the Fgenetic age_. *J Inherit Metab Dis*. 2007:418-20.
15. Diniz EMA, Camargo, M.E.,Costa Vaz, F.A. Toxoplasmose congênita. *Toxoplasmose congênita*. SAO PAULO: ATHENEU 1991:31-72.
16. Figueiro-Filho EA, Lopes, Alessandro Henrique Antunes, Selefonte, Flavio Renato de Almeida et al. Toxoplasmose aguda: Estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005:442-9. .
17. Figueiró-Filho FRdAS, Alessandro Henrique Antunes Lopes, Orlando Oliveira de Morais, Virgílio Gonçalves Souza Júnior,Tamara Lemos Maia e Geraldo Duarte. Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas' disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007:181-7.
18. Foulon W, Villena, I., Strey-Pedersen, B. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: A multicenter study of impact of fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstetric Gynecol*. 1999:410-5.

19. Frankel JK. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today*. 1988:273-8.
20. Gayle G, Sherman GS, Stephanie A. Jones, Pamela Horsfield, and Wendy S. Stevens. Dried Blood Spots Improve Access to HIV Diagnosis and Care for Infants in Low-Resource Settings. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005:615-7.
21. Guthrie R SA. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *PEDIATRICS*. 1963:338-43.
22. Hannon WH, Henderson, L. O. & Bell, C. J. Newborn screening quality assurance. *Genetics and Public Health in the 21st Century: Using Genetic Information to Improve Health and Prevent Disease*. 2000:243-58.
23. Joanne V. Mei JRA, Barbara W. Adam and W. Harry Hannon. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. *The Journal of Nutrition* 2001:1631-6.
24. Jones JL, Lopez, A., Wilson, M., Schulkin, J., Biggs, R. Congenital toxoplasmosis: A Review. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 2001:296-305.
25. Kompalic-Cristo A, Britto, Constanca, Fernades, Octavio. . Diagnostico molecular da toxoplasmosse: Revisão. *J Bras Patol Med Lab*. 2005:229-35.
26. Kristin Skogstrand CKE, Poul Thorsen, Ida Vogel, Bo Jacobsson, Bent Nørgaard-Pedersen , David M. Hougaard. Effects of blood sample handling procedures on measurable inflammatory markers in plasma, serum and dried blood spot samples. *Journal of Immunological Methods*. 2008:78-84.
27. Lopes HJdJ. *Garantia e Controle da Qualidade no Laboratorio Clinico*. Belo Horizonte, 2003.
28. Parker SP TM, Ades AE, et al. Use of dried blood spots for the detection and confirmation of HTLV-I specific antibodies for epidemiologic purposes. *J Clin Pathol* 1995:904-7.
29. Porto Ana Maria Feitosa, Amorim Melania Maria Ramos de, Coelho Isabela Coutinho Neiva, Santos Luiz Carlos. Perfil sorológico para toxoplasmosse em gestantes atendidas em maternidade. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2008 June; 54(3): 242-248.
30. Punnarugsa V, Mungmee, V. Detection of rubella virus immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies in whole blood on Whatman paper: comparison with detection in sera. *J Clin Microbiol*. 1991:2209-12
31. Remington JS, McLeod, R., Thullies, P., Desmonts, G. *Infectious Diseases of the Fetus & Newborn Infant*. 5 ed. Philadelphia: W. B. Saunders 2001.
32. Rizwana Quraishi RL, Dorairaj Prabhakaran,, Jaikhani AKMaB. Use of filter paper stored dried blood for measurement of
33. S. Kouanda RT, V. De Coninck, B. Doulogou, B. Sondo, J.M. Ketelslegers and A. Robert. Reference values of IGF-I in children from birth to 5 years of age, in Burkina Faso, using blood samples on filter paper. Elsevier Ltd 2008.

34. Saúde. BMdSSdVe. Guia de vigilância epidemiológica. In: Ministério da Saúde F, ed.: Editora MS 1998.
35. Sharma SD. Immunology of toxoplasmosis. New York: WD Freeman 1990.
36. Spalding SM, Amendoeira, Maria Regina R., Ribeiro, Luis Carlos et al. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2003:483-91.
37. Tundisi, RN; Bassinello, P, Quarentei, RCA; Lago, APS; Vaz, AJ. Diagnóstico Imunológico de Toxoplasmose: estudo comparativo dos testes imunoenzimático e imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG, LAES e HAES, n°96 agosto/setembro/1995, pág.130.
38. Veronesi R. Tratado de infectologia. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu 2002.
39. Whittle RS-NaMSVDLaSCbDCcSSaTCaH. Evaluation of the dried blood spot filter paper technology and five testing strategies of HIV-1 and HIV-2 infections in West Africa Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2006:1050-6.
40. Zicker ALSSdAeF. Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis. Brasília : Organização Pan-Americana de Saúde : Fundação Nacional de Saúde 1997.