

Validação do teste sorológico para toxoplasmose em papel filtro

Validation of serological test for toxoplasmosis in filter paper

Sarah Ribeiro de Oliveira¹
Karen Ribeiro de Oliveira²
Murilo Barros Silveira²
Hânstter Hállison Alves Rezende³
Flávia Martins Nascente⁴
Ana Maria de Castro⁵
Juliana Boaventura Avelar⁶

Resumo

Objetivo: Validar o uso do teste sorológico para toxoplasmose em papel filtro em amostras de sangue de gestantes do município de Goiânia e região metropolitana. **Métodos:** Trata-se de um estudo prospectivo, onde foram coletadas 1.006 amostras de sangue em gestantes no município de Goiânia e região metropolitana. Todas as gestantes que concordaram participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A avaliação do perfil sorológico foi realizada pela técnica de ELISA (ensaio imunoenzimático), com amostras de soro e papel filtro, para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* das classes IgM e IgG, sendo que o kit utilizado não é padronizado para a pesquisa de anticorpos IgM no papel filtro. A análise estatística foi processada no banco de dados do programa EpiInfo® versão 3.2.1, que avaliou a prevalência de soropositividade, frequência de positividade no soro, frequência de positividade no papel filtro, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e índice *kappa*. **Resultados:** Na análise realizada no soro obtiveram-se 421 amostras positivas para anticorpos da classe IgG e três positivas para anticorpos da classe IgM. Em papel filtro obtiveram-se 443 positivas para anticorpos da classe IgG e uma positiva para anticorpos da classe IgM. **Conclusão:** O estudo permitiu identificar a semelhança de amostras positivas tanto com o uso do soro como no papel filtro para pesquisas de anticorpos da classe IgG, porém, para a pesquisa de anticorpos da classe IgM, o uso do soro apresentou maior sensibilidade quando comparado ao exame realizado com o papel filtro.

Palavras-chave

Diagnóstico; sorologia; gestantes; toxoplasmose

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, geralmente assintomática, causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. A infecção pode ser adquirida por meio da ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais, pela ingestão acidental de oocistos liberados pelas fezes dos felídeos, que podem estar presentes em água e/ou alimentos, ou, ainda, pela transmissão transplacentária por taquizoitos.⁽¹⁾

Nesse caso, o parasito é capaz de atravessar a barreira transplacentária, atingir o concepto e ocasionar a infecção congênita, levando a perturbações neurológicas,

oculares, auditivas e morte intraútero. A taxa de soropositividade materna está relacionada ao contato com uma fonte de infecção, ao número de mulheres susceptíveis, resposta imunológica materna e à prevalência em uma determinada comunidade. A necessidade de um diagnóstico precoce e definitivo se faz necessária porque auxilia na prevenção de casos mais graves.⁽²⁾

No curso da infecção ocorrem quase que simultaneamente, a produção de anticorpos da classe IgM e IgG, que permitem que os testes sorológicos se tornem de grande importância para o diagnóstico e estabelecimento da fase da doença. A distinção entre as fases aguda e crônica é de suma importância clínica, principalmente porque a infecção

¹Biomédica. Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás. Goiânia-GO, Brasil.

²Biomédico. Universidade Federal de Goiás - Goiânia-GO, Brasil.

³Professor do curso de Biomedicina, Unidade Acadêmica Especial de Ciências da Saúde, Regional Jataí, Universidade Federal de Goiás - Jataí-GO, Brasil.

⁴Professora da Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás. Goiânia-GO, Brasil.

⁵Professora no Departamento de Imunologia, Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás - UFG Goiânia-GO, Brasil.

⁶Pesquisadora no Departamento de Imunologia, Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás - UFG Goiânia-GO, Brasil.

Instituição: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás.

Conflito de interesses: sem conflito de interesse
Suporte financeiro: Não houve suporte financeiro.

Recebido em 28/11/2018
Artigo aprovado em 29/05/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900801

vertical ocorre no período inicial da infecção quando a gestante soronegativa passa a ser soropositiva. Existem várias técnicas sorológicas para o diagnóstico da toxoplasmose, e os principais testes são o imunoenzimático (ELISA), teste de hemaglutinação indireto (HAI) e a imunofluorescência indireta (IFI).⁽³⁾

O método laboratorial de escolha utilizado na maioria dos laboratórios clínicos é o imunoenzimático (ELISA), cuja técnica se baseia na pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG e apresentam elevada sensibilidade e especificidade. A detecção de anticorpos IgM são sugestivos de fase aguda, enquanto anticorpos IgG são sugestivos de fase crônica.^(3,4)

O papel filtro é utilizado como uma alternativa para a coleta do sangue total, pelo baixo custo e facilidade no armazenamento e transporte de amostras, uma vez que estas estão estáveis e não infectantes podendo ser transportadas para laboratórios especializados sem a necessidade de refrigeração e acondicionamento especiais. O papel filtro é utilizado principalmente na realização da triagem neonatal (teste do pezinho) e de triagem do pré-natal (teste da mamãe) onde é realizada a pesquisa de anticorpos específicos para diversas doenças como toxoplasmose, vírus da imunodeficiência humana (HIV), sífilis, citomegalovírus, rubéola, hepatites B e C, doença de Chagas e vírus linfotrófico da célula T (HTLV).⁽⁴⁾ Portanto, o objetivo do presente estudo foi validar o uso do papel filtro no teste sorológico para toxoplasmose.

MATERIAL E MÉTODOS

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás com o parecer de N°36980714.5.0000.0037, em consonância às questões éticas contidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Seleção do grupo de estudo

Foi realizado um estudo de prevalência em gestantes, no município de Goiânia e região metropolitana. As pacientes eram provenientes do Sistema Único de Saúde (SUS) e foram atendidas nos serviços de saúde do estado de Goiás, no Centro de Atenção Integral à Saúde (CAIS) Nova Era, no município de Aparecida de Goiânia, na Unidade Básica de Saúde (UBS) da Vila Mutirão, no Hospital e Maternidade Dona Iris e na Secretaria de Promoção Social localizada na cidade de Inhumas-GO, no período de outubro de 2014 a janeiro de 2016.

A seleção das gestantes foi aleatória nas unidades de saúde. Após serem convidadas e receberem todos os esclarecimentos a respeito da pesquisa, as que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLE). Quando menor de idade, foi coletada a assinatura do responsável legal. Em seguida foi aplicado um questionário socioeconômico para avaliação dos hábitos alimentares, fatores demográficos, comportamentais e obstétricos. Todas as perguntas feitas foram relacionadas com os possíveis fatores de risco para adquirir a toxoplasmose, tais como: origem dos alimentos, da água e destino do esgoto, modo de criação de animais domésticos (cães e gatos), hábitos de higiene, dados obstétricos como idade gestacional e relatos de abortos progressos.

Coleta de amostras biológicas

A coleta de sangue venoso foi realizada com a utilização de seringas descartáveis de 5 mL e imediatamente a amostra foi distribuída nas áreas demarcadas no papel filtro Whatman 903®, sendo o restante acondicionado em tubos de 4 mL contendo gel separador para a obtenção de soro, e o material identificado com as iniciais de cada paciente e número de registro. As amostras foram encaminhadas para o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG), para a realização da pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*T. gondii*, tanto no soro como no papel filtro.

Avaliação do perfil sorológico

Foi utilizado o kit comercial SERION ELISA classic®, seguindo todas as orientações do fabricante sendo que este kit é padronizado apenas para pesquisa de anticorpos IgG utilizando papel filtro, porém, nesta pesquisa foram realizados testes de IgM com essa marca para avaliação da acurácia.

O kit SERION ELISA classic® baseia-se na interação específica de anticorpos com os antígenos correspondentes. As cavidades da microplaca são revestidas com antígenos específicos de *T. gondii*. Se existirem anticorpos específicos na amostra, estes serão ligados ao antígeno fixo. Um anticorpo secundário, que foi conjugado com a enzima fosfatase alcalina, detecta e liga-se ao complexo imune (antígeno/anticorpo). O substrato incolor p-nitrofenilfosfato é então convertido no produto corado p-nitroenol. A intensidade do sinal do produto desta reação é proporcional à concentração do analito na amostra e é medido por fotometria.

Os resultados foram apenas qualitativos, expressos em reagentes e não reagentes, tanto para IgG quanto para IgM, podendo ser encontradas qualquer uma das seguintes situações: sororreatividade (IgG reagente/IgM reagente; IgG reagente/IgM não reagente; IgG não reagente/IgM reagente) e susceptibilidade (IgG não reagente/IgM não reagente). Ao finalizar os testes sorológicos, as pacientes que apresentaram sorologia condizente com a fase aguda da infecção foram informadas sobre os resultados e encaminhadas ao clínico que as acompanhava durante o pré-natal.

Análise estatística

Os resultados das sorologias foram processados no programa EpilInfo® versão 3.2.1. Foi realizada a avaliação da prevalência, a frequência de positividade no soro e papel filtro; para a comparação entre as amostras foi calculada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e o índice kappa (κ), sendo que os resultados obtidos a partir da amostra de soro foram adotados como padrão-ouro.

Os cálculos de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e κ foram calculados em tabela de contingência ou tabela 2x2 (Tabela 1).

Tabela 1 - Tabela de contingência 2 x 2 utilizada para análise

Teste	Padrão Ouro		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n

A sensibilidade $a/(a+c)$ é definida como a capacidade de um teste detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes. A especificidade $d/(b+d)$ é definida como a capacidade de um teste detectar os verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos saudáveis. O valor preditivo positivo $a/(a+b)$ é a proporção de doentes entre os positivos no teste. O valor preditivo negativo $d/(c+d)$ é a proporção de saudáveis entre os negativos no teste. O índice kappa informa a proporção de concordância, entre técnicas além do esperado, que varia de "menos 1" (completo desacordo nas leituras) a "mais 1" (completo acordo nas leituras), onde zero indica o mesmo que leituras feitas ao acaso. Tabela 2.⁽⁵⁾

Tabela 2 - Escala de concordância para interpretação do índice 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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 1.006 amostras no papel filtro sendo 443 positivas e 563 negativas para IgG anti-*T. gondii*, uma amostra positiva e 1.005 negativas para IgM anti-*T. gondii*. No soro foram 421 amostras positivas e

585 negativas para IgG, três amostras positivas e 1.003 negativas para IgM (Figura 1).

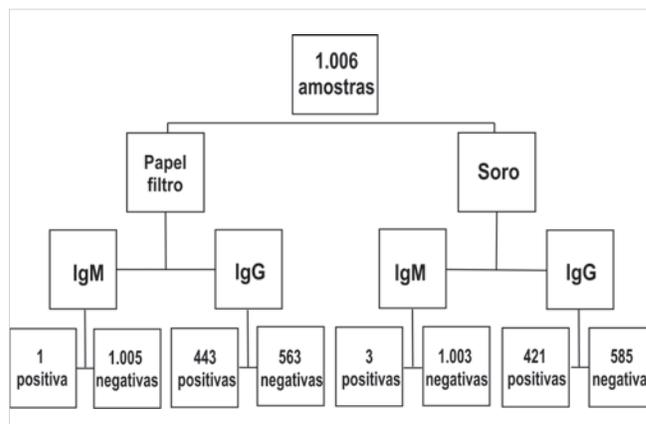


Figura 1. Resultado das amostras analisadas com papel filtro e soro.

A sensibilidade calculada para IgM foi de 33,3% e para IgG foi de 89,3% no papel filtro em comparação com a amostra de soro, sendo que a determinada pelo fabricante no soro foi de 97,8% para IgM e de 98,2% para IgG. Em um estudo com gestantes realizado no estado do Mato Grosso do Sul, foi encontrada uma sensibilidade de 99,4% para IgM e de 99,3% para IgG no papel filtro.⁽⁴⁾ Em Minas Gerais, realizou-se uma comparação entre ensaios imunoenzimáticos em amostras de papel filtro e soro, e a sensibilidade encontrada foi de 56,8% para IgM e de 84,0% para IgG no papel filtro pela técnica de ensaio imunoenzimático por fluorescência (ELFA).⁽⁵⁾ Em Brasília, na análise comparativa entre soro e papel filtro, foi demonstrada uma sensibilidade de 99,83% no papel filtro para IgM.⁽⁶⁾

Analisando-se a sensibilidade na comparação entre soro e papel filtro para diagnóstico de outras doenças infecciosas, no estudo do Mato Grosso do Sul, foi encontrada uma sensibilidade de 100% para citomegalovírus IgM e de 99,6% para IgG, de 99,5% para doença de Chagas IgG, de 100% para herpes simples 1 e 2 IgM, de 97,9% para IgG, de 98,1% para hepatite C IgG, de 99,7% para HBsAg, de 99,5% para anti-HBc, de 100% para HTLV I e II, de 98,9% para sífilis IgG e de 99,6% para rubéola IgM e IgG.⁽⁴⁾ Em outros estudos realizados com papel filtro, no Rio de Janeiro, foi encontrada uma sensibilidade de 100% para detecção de HIV 1 e 2 e para *T. pallidum*,⁽⁷⁾ e para anti-HCV foi de 89,58%;⁽⁸⁾ no estudo realizado no Instituto Oswaldo Cruz, foi encontrada uma sensibilidade de 90,5% para anti-HBc, de 97,6% para HBsAg e de 78,0% para anti-HBs.⁽⁹⁾ No estudo com papel filtro em Goiás foi encontrada a sensibilidade de 100% para doença de Chagas.⁽¹⁰⁾

A especificidade calculada para IgM neste estudo foi de 100% e para IgG de 88,5%, no papel filtro, sendo que a indicada pelo fabricante no soro foi de 95,7% para IgM e de 99,4% para IgG. No estudo do Mato Grosso do

Sul, foi encontrada uma especificidade de 99,8% para IgM e de 99,8% para IgG no papel filtro.⁽⁴⁾ Em Minas Gerais, foi de 98,4% para IgM e de 96,9% para IgG,⁽¹²⁾ enquanto que, no estudo em Brasília, foi encontrada uma especificidade de 98,73% para IgM.⁽⁶⁾

Ao se analisar a especificidade para outras infecções, o estudo do Mato Grosso do Sul encontrou uma especificidade de 97,7% para citomegalovírus IgM, de 100% para IgG, de 99,8% para doença de Chagas IgG, de 98,9% para herpes simples 1 e 2 IgM, de 99,5% para hepatite C IgG, de 99,8% para HBsAg, de 99,8% para Anti-HBc, de 99,9% para HTLV I e II, de 99,9% para sífilis e de 99,8% para rubéola IgM e IgG.⁽⁴⁾ No Rio de Janeiro, foi encontrada uma especificidade de 100% para detecção de HIV 1 e 2 e para *T. pallidum*⁽⁷⁾ e, para Anti-HCV, foi de 99,81%;⁽⁸⁾ no estudo realizado no Instituto Oswaldo Cruz, foi encontrada uma especificidade de 92,6% para anti-HBc, de 96,7% para HBsAg e de 97,3% para anti-HBs.⁽⁹⁾ No estudo com papel filtro para doença de Chagas em Goiás, foi de 100%.⁽¹⁰⁾

O valor preditivo positivo (VPP) foi de 100% para IgM e de 84,9% para IgG. O valor preditivo negativo (VPN) foi de 99,8% para IgM e de 92,0% para IgG. No estudo em Minas Gerais, o VPP encontrado foi de 63,6% para IgM e de 97,3% para IgG, e o VPN foi de 97,5 para IgM e de 96,4% para IgG.⁽⁵⁾ O índice *kappa* calculado para IgG foi de 0,88, sendo classificado com uma ótima concordância entre soro e papel filtro. Para IgM foi de 0,49, classificado com uma concordância regular. Em um estudo realizado em Brasília, o κ encontrado foi de 0,98, indicando uma ótima concordância entre o soro e papel filtro para IgM.⁽⁶⁾

Sugerimos que o κ tenha sido regular para IgM devido ao fato de que o kit utilizado para a realização dos exames ainda não foi validado para utilização do material colhido em papel filtro. Excluímos interferências do fator reumatoide, pois na metodologia utilizada ele é incluído para evitar falsos positivos de IgM.

CONCLUSÃO

Demonstramos uma boa sensibilidade, especificidade e uma ótima concordância para a pesquisa de anticorpos da classe IgG, devido à semelhança entre os resultados encontrados em papel filtro e soro. Porém, a adaptação do uso do Kit comercial para a pesquisa de anticorpos da classe IgM em papel filtro apresentou uma boa especificidade e baixa sensibilidade, demonstrando uma concordância regular quando comparado ao soro.

Devido ao índice *kappa* não ter apresentado valor esperado para IgM como foi para IgG, sugerimos que novas pesquisas sejam realizadas, até que haja a padronização do kit para realização de exames utilizando amostras em papel filtro.

Abstract

Objective: To validate the use of the serological test for toxoplasmosis in filter paper in blood samples from pregnant women from the city of Goiânia and the metropolitan region. **Methods:** This is a prospective study in which 1,006 blood samples were collected in pregnant women in the city of Goiânia and in the metropolitan region. All pregnant women who agreed to participate in the study signed a Free and Informed Consent Form. Serological profile evaluation was performed using ELISA (immunoenzymatic assay), with serum and filter paper samples, to investigate anti-Toxoplasma gondii antibodies of the IgM and IgG classes, and the kit used is not standardized for the research of IgM antibodies on the filter paper. Statistical analysis was performed in the database of the EpiInfo® version 3.2.1 program, which evaluated the prevalence of seropositivity, frequency of serum positivity, filter paper positivity frequency, sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and index the kappa. **Results:** In the serum analysis, 421 samples were positive for antibodies of the IgG class and three were positive for antibodies of the IgM class. In the filter paper yielded 443 positive for antibodies of the IgG class and one positive for IgM class antibodies. **Conclusion:** The study allowed to identify the similarity of positive samples both with the use of serum and in the filter paper for IgG class antibodies. However, for serum IgM antibodies, the use of serum was more sensitive when compared to serum IgG. taken with the filter paper.

Keywords

Diagnosis; serology; pregnant women; toxoplasmosis

REFERÊNCIAS

- Andrade GMQ, Resende LM, Goulart EMA, Siqueira A, Vitor RWA, Januario JN. Deficiência auditiva na toxoplasmose congênita detectada pela triagem neonatal. Rev Bras Otorrinolaringol 2008; 74(1):21-8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992008000100004&lng=en
- Moncada PA, Montoya JG. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012;10(7):815-28.
- Bittencourt LHFDB, Lopes-Mori FMR, Mitsuka-Bregano R, Valentim-Zabott M, Freire RL, Pinto SB, et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gestantes a partir da implantação do Programa de Vigilância da Toxoplasmose Adquirida e Congênita em municípios da região oeste do Paraná. Rev Bras Ginecol e Obs 2012;34(2):63-8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032012000200004&lng=en.
- Figueiró-Filho EA, Senefonte FR, Lopes AH, de Moraes OO, Souza Júnior VG, Maia TL, et al. 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; 40(2):181-7. [Article in Portuguese]
- Marques BA. Comparação entre ensaios imunoenzimáticos realizados em amostras de sangue seco e soro para triagem pré-natal da toxoplasmose: estudo de base populacional. Minas Gerais. Dissertação. [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade Federal de Minas Gerais; 2016. 57 p.
- Minuzzi ALM. Análise comparativa entre testes de ELISA convencional (soro) e papel filtro (sangue seco), para detecção de Toxoplasmose IgM. Brasília. Dissertação [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade de Brasília; 2008. 60 p.
- Gómez J, Appolinário M, Abreu D, Castro A, Martí J, Prates S, et al. Comparação da Coleta das Amostras de Sangue na Triagem Pré-Natal, Utilizando o Papel de Filtro e Punção Venosa na Técnica de ELISA para Detecção de HIV 1+2. J bras Doenças Sex Transm 2010;22(3):123-28.
- Lima MP. Aplicabilidade do Sangue Seco em Papel Filtro para Estudos de Prevalência da Infecção pelo Vírus da Hepatite C em Diferentes Grupos. Rio de Janeiro. Dissertação. [Mestrado em Medicina Tropical] - Instituto Oswaldo Cruz; 2015. 104. p.

9. Instituto Oswaldo Cruz - Ciência para a Saúde da População Brasileira (Comunicação). Nova aposta para diagnóstico da Hepatite B no Rio de Janeiro. Arquivo de notícias [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 07/11/2016]; Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=1535&sid=32&tpl=printerview>
10. Gomes TC. Situação atual de mães cronicamente infectadas pelo tripanosoma cruzi no estado de Goiás e triagem sorológica em recém-nascidos pelo Teste do Pezinho na região metropolitana de Goiânia. Goiânia. Dissertação. [Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro] - Universidade Federal de Goiás; 2016. 52 p.

Correspondência

Sarah Ribeiro de Oliveira
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Universidade Federal de Goiás
Rua 235, s/n, Setor Universitário
74605-050 - Goiânia-GO, Brasil