

INQUÉRITOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS. COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Maria Carolina Soares GUILMARAES

Foi recentemente concluído no Brasil um inquérito soroepidemiológico para levantamento da prevalência da Doença de Chagas no qual cerca de 1650000 amostras de sangue foram colhidas da polpa do dedo em papel de filtro, da população rural de todo o país, à exceção do Estado de São Paulo. Após a coleta, as amostras eram enviadas a laboratórios processadores e 10 a 15% delas eram daí enviadas ao laboratório central onde as duplicatas eram novamente examinadas a fim de se proceder a um controle de qualidade¹.

A coleta de sangue em papel de filtro não é o único método à disposição dos sorologistas para a realização de inquéritos soroepidemiológicos. Porém, será ele o melhor?

Para se colher sangue de uma população tem-se duas abordagens: a punção venosa e a punção epidérmica, quer da ponta do dedo mais habitualmente, quer do lóbulo da orelha ou do calcanhar, em crianças de baixa idade. No caso da punção venosa empregam-se agulhas e seringas ou agulhas adaptadas a tubos plásticos contendo vácuo (vacutainers) e no caso de punção epidérmica empregam-se capilares de vidro ou papel de filtro. O custo do transporte do material do(s) ponto(s) de coleta ao centro processador, especialmente em países do Terceiro Mundo, é fator importante na escolha de qual procedimento será usado na coleta do material pois, à exceção do papel de filtro, os outros envolvem uma etapa de separação do coágulo e refrigeração do soro até o momento do processamento. Se o inquérito requer número elevado de amostras e/ou grandes distâncias entre aqueles pontos, o custo do transporte das amostras de soro torna-se elevado. Acrescenta-se a isto, também, o custo adicional representado pela perda do material em virtude de que-

bra de continentes, erros na identificação das amostras e contaminação do material por condições atmosféricas adversas, como altas temperaturas e umidade, com a conseqüente desnaturação dos anticorpos eventualmente presentes.

Sangue colhido em papel de filtro tem o custo relativo ao transporte e armazenamento muito reduzido em face do menor volume que as amostras ocupam, pelo fato de poderem ser enviadas pelo correio dentro de envelopes comuns e pela inexistência de perdas representadas por quebra de vidraria. As amostras colhidas em papel de filtro estão, evidentemente, sujeitas à contaminação por fungos porém no inquérito soroepidemiológico já referido, tal perda foi mínima.

Algumas destas indagações foram já investigadas. LE VIGUELLOUX & col.¹⁰ enviaram duplicatas de papel de filtro à África que ao retornarem ao laboratório apresentaram títulos que não diferiam daqueles encontrados nas alíquotas que haviam permanecido estocadas no laboratório. Também MARINKELLE & col.¹², verificaram que amostras estocadas desde duas semanas até 16 meses em temperatura superiores a 20°C e umidade relativa maior que 90% se conservaram sem perda de título até três meses e, à mesma temperatura, porém com teor de umidade baixo, conservaram-se até 14 meses.

Outros Autores, entretanto, relataram diferenças nos títulos do eluato de papel de filtro quando comparados com aqueles encontrados no soro dos mesmos pacientes.

Para GUTHE & col.⁷, em reações de imunofluorescência, havia diferença estatisticamente significativa entre os títulos obtidos com eluatos de papel de filtro que houvessem ou não viaja-

do até a África e amostras de soro armazenadas a -20°C em Paris por 20 a 35 dias, sendo que, surpreendentemente, foram as alíquotas de soros que se desnaturaram.

Para vários Autores (CHIN & col.²; NEAL & MILES¹³; KAGAN⁸; GRAB & PULL⁴; LOBEL & col.¹¹; KAGAN & col.⁹ e ROFFI & col.¹⁵, em reações de hemaglutinação passiva e de fixação do complemento, havia concordância geral entre os títulos obtidos com eluatos de papel de filtro e amostras pareadas de soro, que variava entre 75,52% a 93,00% incluindo-se aí uma diluição ao dobro (two-fold) para mais ou para menos. Geralmente as discrepâncias apareceram nas diluições mais baixas, de tal modo que na série estudada por KAGAN⁸ havia 21,90% de "falsos negativos" no papel de filtro versus 6,8% de "falsos negativos" para o soro. Para GRAB & PULL⁴, entretanto, nas diluições inferiores havia concordância de 93,10% (com 6,9% de "falsos negativos" para papel de filtro) porém em diluições maiores que 1:16, 81,92% das amostras concordaram integralmente ou com variação de uma diluição ao dobro para mais ou para menos, sendo que em 19,23% das amostras havia concordância integral. Para estes Autores, o papel de filtro concordava melhor com o soro nas diluições mais baixas. Para LOBEL & col.¹¹ as discrepâncias entre títulos de soros e eluato eram de tal ordem que os Autores questionaram a vantagem da coleta em papel de filtro.

Estes erros experimentais podem ser devidos a pelo menos duas causas: a estimativa da diluição do eluato e, a desnaturação das imunoglobulinas presentes no sangue depositado no papel de filtro, ao longo do tempo.

A questão da estimativa da diluição do eluato sempre preocupou os pesquisadores da área. Assim, alguns como WALTON & ARJONA¹⁷ diziam ter chegado empiricamente à estimativa da diluição do eluato. Outros, como SOUZA & CAMARGO¹⁶ delimitavam uma certa área no papel de filtro e eluíam o sangue aí depositado com quantidade conhecida de eluente. Outros, colocavam quantidade conhecida de sangue sobre o papel de filtro. Outros ainda, pesavam o papel antes e após embebição por sangue para daí deduzir a quantidade adsorvida. NEAL & MILES¹³, conjugando os três métodos verificaram que a diluição do eluato podia variar entre

1:17 a 1:400 e que esta ampla variação era devida ao grau de esparramamento (spreading) da amostra de sangue no papel. GUIMARÃES & col.⁶, tentaram avaliar os dados obtidos por SOUZA & CAMARGO¹⁶, por eletroforese em papel e espectrofotometria dos eluatos de papel de filtro, porém sem sucesso. A eletroforese dos eluatos mostrava um pico representado pela hemoglobina e ausência de região quantificável de gamaglobulinas e à espectrofotometria, interferência da globina da molécula de Hb que não permitia a quantificação das outras proteínas séricas. ROFFI & col.¹⁵ determinaram a qual volume de sangue total e a qual diluição do soro correspondia cada eluato, a partir de amostras de sangue de um mesmo indivíduo que foram colocadas em papel de filtro. Dosaram fotometricamente a concentração de Hb presente nos eluatos tendo preliminarmente determinado o teor em hemoglobina e o valor do hematócrito. Verificaram que a diluição sérica média de uma rodela de papel de filtro era de 1:528 com valores extremos de 1:370 a 1:700, podendo portanto, nos casos mais desfavoráveis a diluição variar ao dobro.

GUIMARÃES⁵ ao estudar amostras de sangue contendo IgG e IgM colhidas e estocadas por 18 meses em papel de filtro e também congeladas, liofilizadas ou adicionadas de igual volume de glicerina, mantidas a -20°C , verificou por imunodifusão radial que a estimativa da diluição do eluato, nos moldes propostos por SOUZA & CAMARGO¹⁶, era significativamente diferente das concentrações obtidas para as amostras preservadas pelos outros três métodos, no tempo 0 (zero) e ao longo de 18 meses de observação. Por reações de imunofluorescência no tempo 0, os títulos das IgM no eluato eram menores que os títulos obtidos pelos três outros métodos, o que não ocorreu para os anticorpos IgG.

Até o momento em que se realizou o Inquérito Soroepidemiológico Nacional da Doença de Chagas os pesquisadores que investigavam a coleta de sangue em papel de filtro por meio de reações de imunofluorescência usavam conjugados antigamaglobulínicos ou, quando outras reações eram usadas (como hemaglutinação ou fixação de complemento), tais reações evidenciavam principalmente os anticorpos da classe IgG ali presentes. No Inquérito Soroepidemiológico já referido, como utilizou-se conjugado anti-IgG, estas imunoglobulinas é que foram

propositadamente investigadas. Havia porém desde 1970, uma indagação de um Comitê de Peritos da Organização Mundial de Saúde quanto à recuperação dos anticorpos IgM no eluato de papel de filtro¹⁴.

Em 1967, entretanto, CUNNINGHAM & col.³ haviam mostrado por reações de imunodifusão radial que a IgM de eluatos de papel de filtro, após 14 dias de estocagem à temperatura ambiente e umidade relativa entre 30 e 90% perdia alguma atividade, após 28 dias as amostras deixadas à temperatura ambiente, com ou sem dessecantes ou, refrigeradas a 4°C, perdiam alguma atividade e, após 48 dias, até mesmo amostras conservadas a -20°C perdiam atividade, achados que justificavam a indagação do Grupo de Peritos a OMS.

De 1967 até o presente, a questão da eluição das IgM do papel de filtro ficou sem resposta. Em 1978, GUIMARÃES & col.⁶ por reações de imunodifusão radial compararam as concentrações de IgM no sangue e em eluatos de papel de filtro estocados por 2,5 meses a -20°C. O resultado da análise estatística mostrou que para ambas as classes de imunoglobulinas, até o final do período de estocagem, não havia diferenças significantes entre as suas concentrações no soro e no papel de filtro. Este período de estocagem foi no entanto estendido para 18 meses e as imunoglobulinas investigadas também por reações de imunofluorescência (GUIMARÃES⁵). A análise deste novo protocolo mostrou que, para anticorpos de classe IgM, as médias geométricas das recíprocas das diluições (MGRD) dos eluatos de papel de filtro aos 0 meses de estocagem, eram menores que as MGRD encontradas para soro que fora congelado, liofilizado ou adicionado de igual volume de glicerina. Entre os 3 e 6 meses de estocagem havia diferenças estatisticamente significantes entre as respectivas MGRDs.

Tais diferenças entretanto, se davam na vigência de médias de concentrações de IgM e IgG (aferidas por reações de imunodifusão radial) estatisticamente mais altas que as encontradas nos outros meios de preservação de amostras, no período 03 e 6 meses de estocagem. Para anticorpos IgG as diferenças estatisticamente significantes, em reações de imunofluorescência, eram vistas após 12 meses de estocagem ou após 9 meses de estocagem, vistas mediante reações de imunodifusão radial.

Embora tais achados em relação à IgM, corroborem as afirmações do Grupo de Peritos da OMS, de modo algum anulam as vantagens anteriormente apontadas para a coleta de sangue em papel de filtro e seu consequente armazenamento. Antes, recomendam-na, evidenciando que as limitações para seu uso devem estar presentes na mente dos pesquisadores para que resultem em benefício do trabalho. Assim, se o interesse é pesquisar anticorpos de classe IgM, o período de estocagem é curto, não devendo ultrapassar de 3 meses (podendo ser aumentado se as amostras são guardadas com dessecantes como sílica-gel) porém, se o interesse é estudar anticorpos de classe IgG, a retenção das IgM pelo papel de filtro virá tornar mais específicos os resultados por anular a interferência ocasionada por reações cruzadas com cadeias leves das IgMs. Tais IgM inespecíficas são comumente encontradas no soro de indivíduos de condição sócio-econômica baixa, submetidos a constantes estímulos imunogênicos bacterianos ou parasitários.

Conhecidas e devidamente compreendidas as limitações relativas ao uso da coleta de sangue em papel de filtro, este é o método mais recomendável para inquéritos soroepidemiológicos em face da sua maior aceitabilidade pelas populações-alvo e baixo custo.

SUMMARY

Seroepidemiological surveys. Sample collection, transportation and storage

Filter paper blood collection for seroepidemiological surveys has been widely used for many years. The method presents several advantages over others namely, allowing collection from all age groups, its low cost (which is an important factor especially in surveys conducted in Third World countries) a smaller overall volume of samples transported from the collection region to the processing laboratory(ies), samples may be sent by ordinary mail to the laboratory and no sample loss due to mislabeling or glass breakage.

Two factors have led to discrepancies found between serum and eluate titers in paired samples studies throughout the literature. One, difficulties in a precise estimative of eluate dilution and second, denaturation of antibodies during filter paper storage.

A precise estimate of eluate dilution is difficult to achieve because it depends on the amount of blood that is deposited on the paper. To this day there are no simple ways to determine on each sample how much blood was absorbed by the filter paper.

Denaturation of immunoglobulin classes upon filter paper storage went undetected for a long time because the techniques employed masked each class individual behavior. Employing monospecific conjugates and antisera it was possible to verify that IgM was eluted from filter paper up to 3 months storage and IgG was similarly eluted up to 12 months as seen by immunofluorescence tests or up to 9 months by radial immunodiffusion tests. Nevertheless, its limitations clearly understood, filter paper blood collection is an important tool for serological surveys.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMARGO, M. E. — Informação pessoal.
2. CHIN, J.; SCHMIDT, N. J.; LENNETTE, E. H. & HANAHOE, M. — Filter paper disc method of collecting whole blood for serologic studies in children. *Amer. J. Epidemiology* 84: 74-80, 1966.
3. CUNNINGHAM, M. P.; BAILEY, N. M. & KIMBER, C. D. — The estimation of IgM immunoglobulin in dried blood for use as a screening test in the diagnosis of human trypanosomiasis in Africa. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hyg.* 61: 688-695, 1967.
4. GRAB, B. & PULL, J. H. — Statistical considerations in serological surveys of population with particular reference to malaria. *J. Trop. Med. & Hyg.* 77: 222-232, 1974.
5. GUIMARÃES, M. C. S. — Estabilidade das imunoglobulinas de classe G e M em amostras de sangue coíhidas em papel de filtro. *Comparação com outros modos de preservação de amostras.* [Tese de livre-docência, Faculdade de Medicina da USP]. São Paulo, 1982.
6. GUIMARÃES, M. C. S.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; CASTILHO, E. A. & NAKAHARA, O. S. — Comparison of IgG and IgM contents in serum and filter paper blood eluates. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 27: 350-353, 1978.
7. GUTHE, T.; VAISMAN, A. & PARIS-HAMELIN, A. — La technique des anticorps fluorescents pratiquée sur sang desseché et élué. *Bull. World Health Org.* 31: 87-94, 1966.
8. KAGAN, I. G. — Evaluation of the indirect hemagglutination test as an epidemiological technique for malaria. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 21: 683-689, 1972.
9. KAGAN, I. G.; GOLDSMITH, R. S.; ZARATE-CAS- TANEDA, R. & ALLAIN, D. S. — Evaluation of serologic tests for studies on Chagas'disease. *Pan American Health Organization Bulletin* 12: 341-349, 1978.
10. LE VIGUELLOUX, J.; BOCHE, R.; ROUX, J. & ALAUSE, P. — Utilization des réactions d'immunofluorescence indirect dans les études épidémiologiques. *Méd. Trop.* 29: 685-688, 1969.
11. LOBEL, H. O.; NAJERA, A. J.; CH'EN, W. I.; MUNROE, P. & MATHEWS, H. M. — Seroepidemiologic investigations of malaria in Guyana. *J. Trop. Med. & Hyg.* 74: 275-284, 1976.
12. MARINKELLE, C. J.; SANCHEZ, N. de; GROGL, M. & GUHL, F. — Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos em papel de filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de infección chagásica con prueba de inmunofluorescencia. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 20: 112-114, 1978.
13. NEAL, R. A. & MILES, R. A. — Indirect hemagglutination test for Chagas disease with a simple method for survey work. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12: 325-332, 1970.
14. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD — Informe de un Grupo Científico. Encuestas serológicas múltiples y bancos de la O.M.S. para sueros de referencia. Organización Mundial de la Salud Serie Informes Técnicos (454), 1970.
15. ROFFI, J.; CARRIE, J.; GAVRE, M. T. & DEDET, J. P. — Dépistage immunoenzymatique de la tripanosomiase humaine africaine utilisant des échantillons de sang seché. *Bull. Soc. Path. Exot.* 73: 67-74, 1980.
16. SOUZA, S. L. & CAMARGO, M. E. — The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American Trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8: 255-258, 1966.
17. WALTON, B. C. & ARJONA, I. — Utilization of whole blood specimens on filter paper for the indirect fluorescent antibody test for toxoplasmosis. *J. Parasitology* 57: 678-679, 1981.

Recebido para publicação em 24/6/1982.