

## Relação entre o diagnóstico sorológico (ELISA) e a gravidade da tuberculose pulmonar na infância

Relationship between serological diagnosis (ELISA) and gravity of pulmonary tuberculosis in children

Clemax Couto Sant'Anna<sup>1</sup>, Leila de Souza Fonseca<sup>2</sup> e Maria Helena Féres Saad<sup>3</sup>

**Resumo** Foram estudadas 48 crianças de 0 a 13 anos através da realização do ensaio imunoenzimático ligado a enzima (ELISA) para pesquisa de anticorpos da classe IgG antiPPD, visando estabelecer correlação entre a resposta imune humoral medida pela sorologia e a gravidade da tuberculose, segundo formas radiológicas (leve, moderada e grave). A amostra foi composta de 29 crianças com tuberculose e 19 sem tuberculose comunicantes de tuberculose). Os valores médios (medianas) da densidade óptica do teste ELISA foram, respectivamente: 0,098 na forma gânglio-pulmonar (leve), 0,092 na forma pneumônica (moderada) e 0,134 na tuberculose miliar (grave). Nas crianças não tuberculosas com radiografia de tórax normal, o ELISA foi igual a 0,020. Os achados evidenciam valores mais elevados do teste sorológico relacionados à maior gravidade da doença ( $p=0,0007$ ).

**Palavras-chaves:** ELISA. Tuberculose pulmonar. Crianças. Diagnóstico sorológico.

**Abstract** Forty eight children from 0 to 13 years old were submitted to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) serological test with a view to detect anti PPD IgG antibodies, for diagnosis of pulmonary tuberculosis and to establish the relationship between immune response and radiological gravity of pulmonary tuberculosis (mild, moderate and severe). There were 29 children with pulmonary tuberculosis and 19 children without tuberculosis. The median ELISA optical density were: 0.098 in children with primary complex (mild); 0.092 in children with pneumonic pattern (moderate) and 0.134 in children with miliary tuberculosis (severe). These data show higher positive serological test results in severe forms of pulmonary tuberculosis ( $p=0.0007$ ).

**Key-words:** ELISA. Pulmonary tuberculosis. Children. Serodiagnosis.

A tuberculose no Brasil, guardadas as diferenças regionais do país, ainda detém elevadas taxas de incidência. Nos últimos cinco anos, vem sendo notificados cerca de 85.000 casos novos por anos. A situação da doença no Estado do Rio de Janeiro, revela o coeficiente de incidência mais elevado no país, de 111,7/100.000 habitantes. Na cidade do Rio de Janeiro, seu coeficiente de incidência de 54,7/100.000 habitantes, representa o dobro da média nacional. Em 1997 foram notificados à Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, 10.073 casos. No período de 1995 a 1997, cerca de 6% dos casos notificados eram de menores de 15 anos, dos quais 71,5% apresentavam tuberculose pulmonar<sup>5</sup>. Um dos obstáculos ao conhecimento da verdadeira situação da tuberculose infantil, não só no Brasil mas em todo o mundo, é a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico da doença em crianças que geralmente, são abacilíferas.

O primeiro contato do organismo humano com o *Mycobacterium tuberculosis*, denomina-se primo-infecção, na qual há sequência de eventos que vão da chegada do bacilo, quase sempre pela via inalatória, à formação do complexo primário e ao estabelecimento da imunidade adquirida, predominantemente celular que quase sempre leva o hospedeiro a suplantar a agressão da primo-infecção e a detê-la.

A atuação da imunidade humoral parece ser relevante nas fases iniciais da lesão tuberculosa, quando os macrófagos ativados iniciam a fagocitose de bacilos, cujos antígenos são capazes de propiciar resposta de linfócitos B. Estes, seriam estimulados pelas células T *helper* e sintetizariam lisozimas, imunoglobulinas capazes de inativar produtos de defesa e de degradação do *M. tuberculosis*, que é considerada a principal ação da imunidade humoral na tuberculose.

Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira e Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ. 1. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2. Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 3. Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Endereço para Correspondência: Dr. Clemax Couto Sant'Anna. R. Sá Ferreira 159/402, Copacabana, 22071-100 Rio de Janeiro, RJ.

Tel: 55 21 2571-0752

e-mail: clemax@vetor.com.br

Recebido para publicação em 16/6/1999.

A imunoglobulina G (IgG) específica tem papel importante na resposta à agressão do microorganismo. Entretanto, parece que na fase inicial é maior a participação da IgA, enquanto mais tardiamente destaca-se a IgG<sup>3,9,10</sup>.

Dependendo da resposta exaltada da imunidade celular, se houver alta concentração de linfócitos T supressores, a imunidade humoral terá participação discreta.

Os métodos sorológicos de diagnóstico na tuberculose vem sendo valorizados, porém não são disponíveis na rotina, mesmo em países desenvolvidos que ainda os reservam a situações experimentais<sup>8</sup>.

Em se tratando de crianças, pela dificuldade de se obter positividade bacteriológica, o diagnóstico sorológico poderia ser útil para complementar os critérios diagnósticos convencionais, baseados no quadro clínico-radiológico, em dados epidemiológicos e no teste tuberculínico<sup>11</sup>.

O método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), isto é, ensaio enzimático ligado a enzima, utiliza antígeno fixado em placa na qual é incubado o soro em que se deseja testar a presença de anticorpos que, posteriormente, entra em contato com um segundo anticorpo antiimunoglobulina marcado com enzimas<sup>5</sup>.

## PACIENTES E MÉTODOS

O estudo transversal de teste diagnóstico, foi realizado prospectivamente com crianças internadas no Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPGM) e atendidas no ambulatório do Instituto de Tisiologia e Pneumologia (ITP), ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

**Pacientes. Critérios de seleção:** foram estudadas 48 crianças e adolescentes de famílias de baixa renda, de ambos os sexos, com idades variando de 0 a 13 anos, sendo 29 tuberculosas e 19 não tuberculosas, sadias, contactantes de tuberculosos.

O diagnóstico de tuberculose foi feito com base em dados clínicos, radiológicos, epidemiológicos e evolutivos, sendo que em 17 casos houve confirmação bacteriológica, através de cultura para *M. tuberculosis* do lavado gástrico.

Foi considerado caso de tuberculose, a criança que tivesse cultura positiva para *M. tuberculosis* ou que preenchesse os seguintes critérios:

1) quadro clínico-radiológico de pneumonia com evolução igual ou superior a 15 dias, não responsiva a antibioticoterapia sem ação comprovada contra o *M. tuberculosis*; 2) contato com adulto bacilífero nos últimos 12 meses.

**Ensaio sorológico:** O ensaio imunoenzimático visou a detecção de anticorpos da classe IgG respondedores ao antígeno PPD Rt-23. Empregou-se solução antigênica com PPD para sensibilização da placa na concentração de 10 microgramas/ml de Tampão Carbonato pH=9,6 para o sensibilizar os orifícios da microplaca Immulon I, fundo reto (*Dynatech, VA, USA*).

O ELISA foi inicialmente desenvolvido por Engvall & Perlman<sup>6</sup>. e por van Weeman & Schuurs<sup>14</sup> e, posteriormente, muito utilizado como teste diagnóstico em varias doenças. Em tuberculose os anticorpos pesquisados, geralmente são da classe IgG, cuja elevação mais marcada costuma ocorrer em pacientes com doença em atividade.

O diagnóstico sorológico da tuberculose também recebeu grande contribuição com a identificação de anticorpos monoclonais de micobactérias permitindo isolar antígenos bacterianos específicos<sup>3</sup>.

Fonseca et al<sup>7</sup> procuraram estabelecer correlação entre a positividade da resposta imune e a gravidade das formas clínicas de tuberculose, em adultos e crianças, medida pela resposta ao teste ELISA. Seus achados apontaram para a maior formação de anticorpos nas formas mais avançadas de tuberculose, principalmente nos pacientes pediátricos.

Neste sentido, desenvolveu-se o presente trabalho que tem por objetivo estudar o comportamento do diagnóstico sorológico da tuberculose pulmonar na infância em relação à gravidade da doença.

Cem microlitros da solução foram utilizados em cada orifício e deixados *overnight* a 4°C. Após lavagem da placa com PBS-Tween 20 0,1% (PBST) e bloqueio dos espaços interantígenos com o PBSt-BSA 1%, o soro do paciente foi diluído a 1:160 em tampão PBST e adicionado aos respectivos orifícios. Após incubação por uma hora a 37°C, foi realizada nova lavagem e adicionado conjugado anti-IgG humana-beta galactosidase (*BIOSYS, Compiègne, France*) na diluição de 1:1000 em PBST-BSA. Após incubação por uma hora a 37°C, seguida de nova lavagem foi adicionada a solução substrato-reveladora, contendo 0,8mg/ml de o-nitrophenyl-beta-galactopyranizidio (*Sigma, USA*), 90 microlitros beta-mercaptoetanol e tampão fosfato (0,1 MK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>). Após incubação de uma hora a 37°C, interrompeu-se a reação com carbonato de sódio a 32%. Os valores da absorbância foram obtidos no leitor *Titertek Multiskan* com filtro de 405µm. Todas as placas utilizadas para os testes foram incluídas dois soros referência negativo e positivo, para corrigir possíveis variações diárias da sorologia.

Para comparação das variáveis estudadas em ambos os grupos foram calculadas as medianas para expressar os valores médios de densidade óptica (DO) do teste ELISA, por se tratar de amostra que não obedece à distribuição normal. Desta forma, foi possível comparar os resultados do presente estudo com outros da literatura.

Os soros coletados foram congelados e os testes foram feitos simultaneamente, *a posteriori* da conduta clínica traçada para os pacientes.

A gravidade da forma de tuberculose foi estabelecida segundo critério radiológico que possibilitou definir as seguintes formas<sup>12</sup>: leve – padrão

gânglio-pulmonar; moderada – imagens de condensação pulmonar; grave – imagem hematogênica (infiltrado de padrão miliar).

**Análise estatística.** Os dados obtidos foram tabulados com auxílio de microcomputador e do pacote

estatístico EPI INFO 6, empregando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis e considerando-se o nível de significância do valor de  $p < 0,05$ . A análise estratificada utilizou para comparação das medianas o teste de Mantel-Haenszel.

## RESULTADOS

A análise quanto à classificação de gravidade radiológica nas 28 crianças com tuberculose mostrou a ocorrência de formas leves em nove (31%) pacientes, moderadas em 12 (41,4%) e graves em oito (27,6%). As 19 radiografias dos comunicantes de tuberculose eram normais.

A Tabela 1 descreve a análise do teste sorológico em relação às variáveis idade, teste tuberculínico e situação vacinal com BCG que não mostrou diferença estatística. Entretanto, foi observada uma diferença significativa entre os níveis de ELISA e as formas radiológicas de tuberculose, mostrando que títulos

*Tabela 1 - Avaliação das medianas de densidade óptica (DO) do ELISA, em relação à idade, teste tuberculínico, situação vacinal com BCG e forma radiológica, em 48 crianças e adolescentes.*

Variável	N	ELISA (DO)	KW	Valor p
<b>Idade</b>				
<1 ano	8	0,117		
1 a 3 anos e 11 meses	17	0,055		
4 a 9 anos e 11 meses	15	0,0505		
≥10 anos	8	0,040	2,383	0,082
<b>Teste tuberculínico</b>				
não reator	13	0,080		
reator fraco	8	0,027		
reator forte	25	0,050	2,624*	0,06
<b>Vacinação BCG</b>				
não	19	0,090		
sim	20	0,050	1,305	0,52
<b>Forma radiológica (gravidade)</b>				
radiografia normal	19	0,020		
gânglio-pulmonar (leve)	9	0,098		
pneumônica (moderada)	12	0,092		
miliar (grave)	8	0,134	16,955	0,0007

Legenda: KW = Teste de Kruskal-Wallis

\* Associação influenciada por efeito de confundimento

elevados do teste estavam relacionados a formas graves da doença ( $p = 0,0007$ ). Ainda na Tabela 1 observa-se associação entre ELISA e o teste tuberculínico, sugerindo que títulos elevados do ELISA poderiam estar relacionados ao teste não-reator ( $p=0,060$ ). A Tabela 2 compara o teste tuberculínico e formas radiológicas de tuberculose e mostra que o teste tuberculínico não

reator apresentou associação com as formas mais graves da doença ( $p=0,007$ ). Logo, tornou-se necessário avaliar se a associação ELISA e teste tuberculínico seria ou não fruto de fator de confusão. Através da análise estratificada de Mantel-Haenszel foi possível controlar o efeito da gravidade da doença, mostrando não haver relação entre ELISA e o teste tuberculínico (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

A radiografia de tórax tem papel fundamental no diagnóstico da tuberculose na infância, pois, com alguma frequência a doença evolui de forma silenciosa, a ponto de se constatar a dissociação clínico-radiológica, na qual pacientes assintomáticos ou oligossintomáticos exibem extensas lesões radiológicas. Não há unanimidade quanto à classificação radiológica da tuberculose na infância. Adotamos três categorias: gânglio-pulmonar, pneumônica e miliar, que já havíamos empregado em trabalhos anteriores, pois simplifica a diversidade de aspectos radiológicos próprios da

doença e procura padronizar a interpretação por vários observadores<sup>12</sup>. Esta abordagem permitiu estabelecer a classificação de gravidade da tuberculose empregada no presente estudo.

Em nosso estudo, houve predominância da forma moderada de tuberculose, sobre as demais. Isto porque o padrão radiológico que permitiu tal classificação, na verdade foi o principal critério de inclusão de doentes na pesquisa, daí sua maior frequência.

A sorologia pelo método ELISA aqui empregada, usou o PPD como antígeno, por sua facilidade de

Tabela 2 - Comparação entre o padrão radiológico e o teste tuberculínico.

Forma radiológica (gravidade)	Teste tuberculínico			total
	não reator	reator fraco	reator forte	
Radiografia normal	1	5	13	19
Gânglio-pulmonar (leve)	1	1	6	8
Pneumônica (moderada)	6	0	5	11
Miliar (grave)	5	2	1	8
Total	13	8	25	46

$X^2 = 25,42$   $p = 0,0076$

Tabela 3 - Relação entre teste tuberculínico e ELISA de acordo com a forma radiológica da tuberculose.

Forma radiológica (gravidade)	Teste de Kruskal-Wallis	Valor p
Radiografia normal	0,198	0,906
Gânglio-pulmonar (leve)	2,083	0,353
Pneumônica (moderada)	0,000	1,000
Miliar (grave)	1,200	0,549

obtenção e baixo custo, em detrimento de antígenos mais específicos que vem sendo descritos na literatura. Deve-se assinalar que em geral, os valores de DO em crianças com tuberculose são mais baixos do que em adultos. Nossa experiência com ELISA pesquisando IgG anti-PPD<sup>13</sup> mostrou resultados de sensibilidade e especificidade semelhantes aos de Barrera et al<sup>2</sup>, na Argentina que empregaram o antígeno 5 de Daniel, para diagnóstico de tuberculose em crianças.

No presente estudo, avaliou-se a mediana da densidade óptica (DO) do teste ELISA, em relação à faixa etária das crianças, ao comportamento do teste tuberculínico e à gravidade da tuberculose. Buscou-se, desta forma, estabelecer possíveis correlações da resposta imune humoral, medida pelo ELISA, com atributos do hospedeiro. Não se encontrou correlação com o teste tuberculínico, a vacinação BCG e a idade, uma vez que os testes estatísticos não foram significantes, à semelhança dos resultados de Alde et al<sup>1</sup> em crianças. Observou-se porém, que a mediana da DO de crianças com menos de um ano mostrou valores mais elevados do que os encontrados nas outras faixas etárias, porém sem significância estatística. Talvez com amostra maior fosse possível dados mais consistentes.

Ao se proceder à análise da gravidade radiológica da tuberculose, constatou-se que ocorreram valores mais elevados entre os pacientes com forma grave; valores intermediários nas forma moderada e leve e mais baixos nas crianças sem tuberculose, com significância estatística. A análise estratificada, para afastar fatores de confundimento veio confirmar este achado. Tal observação reitera a noção da maior participação da imunidade humoral nas formas mais graves, ou mais extensas, quando a imunidade celular teria sido depletada, como já havia sido apontada por Fonseca et al<sup>7</sup>.

Concluindo, a utilização do ELISA no diagnóstico de tuberculose pulmonar em crianças, correlacionou-se estatisticamente, com a gravidade radiológica da doença, isto é, valores mais elevados foram obtidos em formas consideradas mais graves, como a miliar.

Sabe-se que muitos casos de tuberculose em crianças passam despercebidos, com retardo de diagnóstico e que sem o tratamento adequado podem vir a falecer. A importância prática de tal achado, seria o fato de permitir o diagnóstico rápido e o conseqüente início de tratamento, em casos suspeitos de formas graves de tuberculose na infância.

#### AGRADECIMENTOS

Aos Professores: Afrânio Kritski (UFRJ) pela cessão dos soros das crianças comunicantes de tuberculosos; José Uéleres Braga (UERJ) e Antonio J.L. Alves da Cunha (UFRJ) pelas sugestões metodológicas; Bernardo Rangel Tura (UERJ) pela análise estatística e sugestões na revisão do texto.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alde SLM, Piñasco HM, Pelosi FR, Budani HF, Palma-Beltran OH, Gonzales-Montaner LJ. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an IgG antibody to *M. tuberculosis* antigen 5 in the diagnosis of tuberculosis in children. *American Review Respiratory Diseases* 139: 748-751, 1989.
- Barrera L, Miceli I, Ritacco V, Torrea G, Broglia B, Botta R, Maldonado CP, Ferrero N, Pinasco A, Cutillo I, Cornejo M, Prokopio E, Kantor I. Detection of circulating antibodies to purified protein derivate by enzyme-linked immunosorbent assay: its potential for the rapid diagnosis of tuberculosis. *Pediatric Infections Disease Journal* 8: 763-767, 1989.
- Benjamin RG, Daniel TM. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to *M. tuberculosis* antigen 5. *American Review Respiratory Diseases* 126: 1013-1016, 1982.

4. Cavalcante SC, Pacheco AG, Lauria L, DeRiemer K, Durovni B. Epidemiologia da tuberculose no Município do Rio de Janeiro. Revisão de casos notificados de 1995 a 1997. *Boletim Pneumologia Sanitária* 6: 81-92, 1998.
5. Diaz ES. Imunologia de tuberculosis: metodos diagnosticos. *In: Seminário Regional de Tuberculosis (Publicação Científica 511). Organización Panamericana de la Salud/Organización Mondiale de la Salud, 1988.*
6. Engvall E, Perlman P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874, 1971.
7. Fonseca LS, Kritski A, Sant'Anna CC, Janini MC, Ferreira MA, Saad MH. Relationship between immune response and clinical manifestations in patients with tuberculosis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 25: 49-52, 1992.
8. Krambovitis E. Serodiagnosis of tuberculosis in perspective. *Serodiagnosis Immunotherapy* 1: 7-19, 1987.
9. Lima RJ, Madi K. Patogenia e anatomia patológica. *In: Sant'Anna CC, Bethlem N (eds) Tuberculose na infância. 2ª edição. Cultura Médica, Rio de Janeiro p.17-26, 1988.*
10. Marques R. Imunidade e hipersensibilidade. *In: Sant'Anna CC, Bethlem N (eds) Tuberculose na infância. 2ª edição. Cultura Médica, Rio de Janeiro, p.13-16, 1988.*
11. Ministério da Saúde. Manual de normas para o controle da tuberculose. Brasília, 1988.
12. Sant'Anna CC. Tuberculose na infância: rotina para diagnóstico e tratamento. *Clinical Pediatrics* 13: 44-49, 1989.
13. Sant'Anna CC, Fonseca LS. Evaluation of serological method for diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. *International Journal Tuberculosis Lung Diseases* 3: 774, 1999.
14. Van Weeman BK, Schuurs AHM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters* 15: 232-236, 1971.