

Artigo original

Diagnóstico laboratorial da tuberculose na infância: métodos convencionais e métodos rápidos.

Laboratorial diagnosis of Childhood tuberculosis: conventional and rapid methods.

Terezinha M. Martire¹.

RESUMO

O diagnóstico da tuberculose (TB) em crianças continua sendo feito em bases clínicas, epidemiológicas e radiológicas. Entretanto, com o advento da Aids e também das formas atípicas e resistentes, há preocupação de se fazer o diagnóstico em bases laboratoriais. Diversas técnicas têm sido testadas como alternativas aos métodos convencionais de diagnóstico, como culturas em meios líquidos automatizados (MBbact e MGIT 960), reação de polimerase em cadeia (PCR), testes sorológicos pela técnica de ELISA, com antígenos purificados específicos recombinantes isolados ou combinados, atividade da adenosina deaminase (ADA) em TB de serosas, testes de interferon-gama (IGRAs) e o teste de observação microscópica de susceptibilidade aos antimicrobianos (MODS). Muito embora hajam alguns resultados promissores, há necessidade de mais estudos para se conhecer o real papel destes testes e sua aplicabilidade, se comparados aos testes convencionais, em diferentes situações próprias da criança com TB, isto é: vacinados com BCG, diferentes condições nutricionais, diferentes faixas etárias, infectados ou não pelo HIV. A rapidez, o baixo custo e a exequibilidade devem ser levados em consideração, principalmente em países em desenvolvimento.

Descritores: tuberculose, diagnóstico, bacteriologia, sorologia, criança.

ABSTRACT

TB diagnosis in children continues to be based on clinical, epidemiological and radiological findings. However, with the emergence of AIDS and atypical and resistant forms of the disease, diagnoses based on laboratory findings are preferred. Many techniques have been tested as an alternative to the conventional methods of diagnosing active or latent TB, such as automated liquid culture systems (MB/BacT and MGIT 960), polymerase chain reaction (PCR), serological testing using ELISA with specific and purified recombinant antigens alone and/or in combination, adenosine deaminase (ADA) activity in TB involving serosa, Interferon Gamma Release Assays (IGRAs) and microscopic observation drug susceptibility assay (MODS). Although some promising results, more studies are needed to get to know the real role of these tests and their usefulness, when compared with the conventional tests, in different childhood TB children settings: individuals who have been vaccinated with BCG, with different nutritional status, different age groups, HIV infected or not. Their speed, low cost and feasibility should be taken into account, especially in developing countries.

Keywords: Tuberculosis, diagnosis, bacteriology, serology, child.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um milhão de casos de tuberculose (TB) ocorrem em crianças entre 0 e 15 anos. O número de óbitos, nesta faixa de idade, pode chegar a 450.000 / ano. O crescente número de casos entre adultos, assim como a elevação na taxa de co-infecção TB/HIV (vírus da imunodeficiência humana), tornou-se uma fonte de TB infecção cada vez maior para o grupo pediátrico.^{1,2}

Há grande dificuldade de se detectar o *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) nos espécimes clínicos coletados de crianças com suspeita de TB. Tal se deve a: dificuldade na coleta dos espécimes clínicos, baixa sensibilidade dos espécimes propriamente dita e dos testes bacteriológicos, por serem amostras paucibacilares, e tempo prolongado para obtenção de resultado das culturas em meio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ). Menos de 20% dos pa-

1. Professora Adjunta da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Unirio). Trabalho realizado na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Unirio). Não há conflito de interesse.

cientes pediátricos com TB notificada têm pesquisa direta para bacilo álcool ácido resistente (BAAR) positiva, e 30-50 % têm cultura positiva no espécime clínico coletado.³⁻⁷

Nas últimas décadas, com o advento da Aids e o surgimento de formas atípicas, multiressistentes (MDR) e disseminadas de TB, além de outras micobacterioses, há um esforço mundial no desenvolvimento de métodos não convencionais, factíveis e de baixo custo para o diagnóstico de TB, no adulto e em crianças, devido a sua característica paucibacilar.

Diversas técnicas que serão tratadas no presente artigo têm sido testadas como alternativas aos métodos convencionais de diagnóstico da TB doença ou TB infecção ou latente.

MÉTODOS CONVENCIONAS DE DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

1. *Baciloscopia*

A demonstração da presença de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) no espécime clínico é evidência presuntiva da TB, mas não de certeza, já que outras micobactérias também apresentam as mesmas propriedades morfotintoriais.

A pesquisa do BAAR em secreções e/ou fluidos corporais pela microscopia óptica, após coloração pelo método de *Ziehl-Nielsen*, é o exame mais difundido, devido ao baixo custo, rapidez e fácil execução nas unidades de saúde. Entretanto, tem como limitação a baixa sensibilidade (10-15%) para espécimes com concentração bacilar menor que 5×10^3 bacilos/mL, o que explica o resultado negativo nas formas paucibacilares da criança.⁸⁻¹⁰

2. *Cultura para micobactérias em meio de Lowenstein-Jensen*

O isolamento e a identificação de *M.tb* em meio de cultura é um método mais sensível que a bacterioscopia. A cultura é feita através da sementeira do espécime clínico em meios próprios. No Brasil, o mais utilizado é o meio sólido de *Lowenstein-Jensen* (LJ). Necessita de 10 a 100 bacilos por mililitro de espécime clínico para ser positiva. Há reconhecida limitação do diagnóstico bacteriológico na infância, pois sabe-se que a maioria das formas de TB é paucibacilar.¹¹

A cultura positiva é conclusiva, permite a identificação de *M.tb* pelos testes bioquímicos e a realização do teste de sensibilidade aos tuberculostáticos. Fornece resultados após quatro a oito semanas. Os meios enriquecidos e de maior custo podem ser utilizados para a cultura, fornecendo resultado em duas ou três semanas, dentre eles: os meios líquidos Midlebrook 7H9 e 7H12.

MÉTODOS RÁPIDOS

1. Teste de microscopia de observação com luz invertida (MODS).

O teste de microscopia de observação com luz invertida foi, primeiramente, descrito por Caviedes e cols¹² no Peru, na década de 1990. É utilizado, não só para detecção de cepas de micobactérias, mas também para testar sensibilidade aos fármacos tuberculostáticos. É um meio de cultura líquido, simples, rápido e de baixo custo. Pode ser utilizado em laboratórios de recursos limitados de países em desenvolvimento.¹³

A cultura para micobactéria em meio sólido convencional é mais sensível que o exame direto (BAAR); entretanto, os métodos envolvendo meios sólidos têm a desvantagem de serem demorados (de 4 a 8 semanas). Os meios líquidos são mais rápidos, duram em média sete dias, variando de cinco a 10 dias.^{8,14} O MODS teste, tem como principal vantagem o crescimento relativamente rápido com uma *performance* prática similar ao esfregaços feitos para realização de microscopia direta. A sensibilidade do MODS é superior à da cultura em meio de LJ (em torno de 50%), mas inferior à sensibilidade do MGIT automatizado 960; porém, seu custo é oito a 10 vezes inferior ao último.^{14,15}

O MODS teste é um meio líquido enriquecido (Midllebrook 7H9) que faz a detecção do crescimento micobacteriano precoce que ocorre nos poços das placas de cultura. Toma o aspecto em corda, quando os bacilos se proliferam, característico do *M.tb*. (Figura 1). O complexo *M. avium-intracelulare* e *M. Kansasii* são bem diferenciados do *M.tb* ao MODS teste, pois estes não adquirem, no seu crescimento, o aspecto em corda, com exceção do *M. chelonae*, única micobactéria não tuberculosa (MNT) que durante seu crescimento pode tomar a forma de corda, é saprófita (água, solo e de partículas de poeira) e raramente pode causar infecção.¹⁴

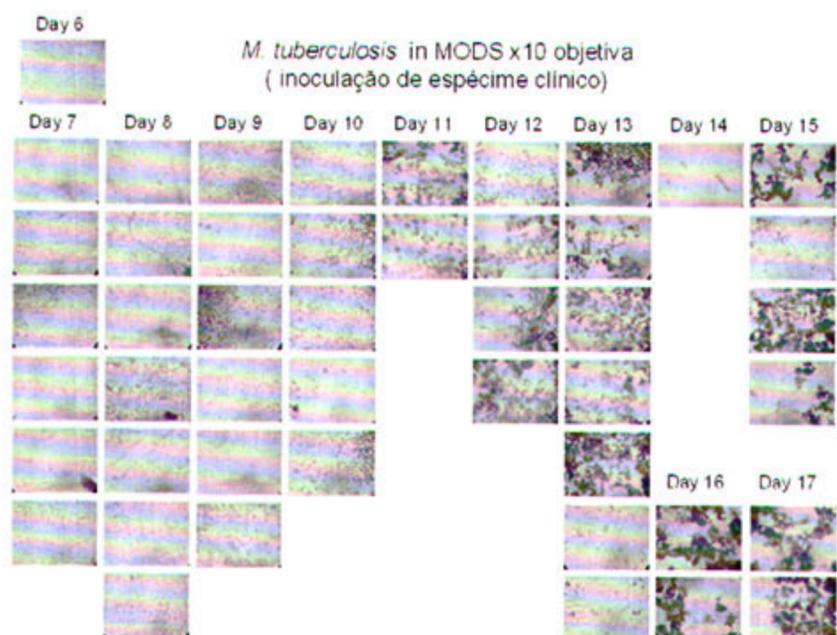


Figura 1 – Técnica MODS em espécime clínico, com o aspecto em corda demonstrando o crescimento do *M. tuberculosis*. Fonte: www.bioline.org.br modificado

O espécime clínico, após descontaminação para germes comuns, é colocado em poços de placas esterilizadas para cultura com 1 mL de meio MODS. Em seguida, a placa com diversos espécimes de diferentes

pacientes é incubada a 37°C em 10% de CO₂. Avalia-se a morfologia da película micobacteriana de cada poço pelo microscópio de luz invertida, com aumento de 10x a 40x, caso tenha ocorrido crescimento de *M.tb*. Examina-se a placa, em média, duas vezes por semana. A cultura em MODS também identifica micobactérias multirresistentes (MDR). O crescimento em placas cujos poços contêm substâncias anti-TB indicam resistência antimicrobiana. A identificação de TB-MDR alcança sensibilidade e especificidade de 95% e 100 %, respectivamente.¹⁶ Detecta sensibilidade a isoniazida, a rifampicina e etambutol e a estreptomina.^{12, 16, 17} Muito embora existam poucos trabalhos em crianças, a cultura em MODS mostrou-se similar ao MGIT 960, porém com sensibilidade superior à cultura em LJ. Do mesmo modo, diante de espécimes clínicos negativos ao exame direto pelo método de Ziehl-Nielsen (ZN), ou pela auramina rodamina, o MODS foi mais sensível que a cultura em meio LJ na detecção do *M.tb*.¹⁵

2. BACTEC

Sistema de cultura por método radiométrico, atualmente em desuso em nosso meio. Tem como vantagem a redução do tempo de cultivo para 14 dias e como desvantagem o alto custo do equipamento e dos insumos para ser implementado na rotina da rede pública.¹⁸

Os derivados do Bactec, MB/bact e MGIT 960, vêm ocupando um lugar de destaque nos laboratórios de referência, devido à sua elevada sensibilidade, se comparada aos meios sólidos ou MODS teste. São meios de cultura não seletivos, totalmente automatizados, que recuperam as micobactérias do sangue, ou de qualquer outro espécime clínico, em aproximadamente 10-15 dias. A detecção colorimétrica, não-radiométrica, do crescimento micobacteriano elimina o manuseio e exposição a radioisótopos. Apresentam bom rendimento, também, em espécimes clínicos de pacientes com co-infecção TB/HIV.¹⁸

3. BACTEC MGIT 960 –Tubo indicador de crescimento de micobactéria

Trata-se da sementeira de espécime clínico em tubo de cultura em meio líquido (7H9), no qual há base de silicone impregnada de rutênio. Este elemento emite luminescência de tom alaranjado quando há diminuição de O₂ no meio, o que ocorre pelo metabolismo da micobactéria em crescimento. A luminescência é detectada por luz ultravioleta. O meio líquido de sementeira tem sensibilidade significativamente maior na detecção de *M.tb* do que o meio de LJ, em pacientes HIV positivos ou negativos e quando o paciente iniciou tuberculostáticos há poucos dias. A segunda vantagem é o encurtamento do tempo de obtenção de cultura positiva – em média 12 dias – para o *M.tb* e para MNT.¹⁹ Qualquer tipo de espécime coletado, além de sangue e urina, pode ser semeado.²⁰ O sistema automatizado não permite a identificação morfológica da micobactéria, logo há ne-

cessidade de esfregaço pelo método ZN ou de testes bioquímicos. Em crianças com formas disseminadas de TB, imunodeprimidos pós transplante ou com Aids, pode-se obter cultura de sangue para TB através de ISOLATOR. Este tubo é o único meio de cultura rápido para sangue que permite recuperar micobactérias circulantes no meio intracelular. Os microorganismos centrifugados podem ser semeados em qualquer meio, de preferência meios líquidos.¹⁴

TESTES BASEADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO – AAN

Na última década, a técnica tem sido utilizada na identificação rápida de *M. Tb*, diretamente do espécime clínico ou em material de cultura. Utiliza-se, também, para genotipagem de bacilos resistentes e para tipagem molecular em investigações epidemiológicas.

Para amplificação de ácidos nucleicos, foi desenvolvida a técnica conhecida como reação em cadeia pela polimerase ou *polymerase chain reaction* (PCR).²¹ Esta técnica proporciona a amplificação a partir de DNA (ácido desoxirribonucleico) ou RNA extraído do organismo alvo, viável ou não, levando à produção de múltiplas cópias da seqüência alvo, flanqueada por iniciadores (*primers*) homólogos a esta seqüência. A PCR é aplicável mesmo quando a quantidade de DNA disponível é reduzida. A seqüência de DNA freqüentemente utilizada para detectar o *M.tb* tem sido o elemento de inserção *IS6110*. Nesta técnica, são usadas elevadas temperaturas para separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples (denaturação). Assim, ocorre a ligação de oligonucleótidos iniciadores, seqüências nucleotídicas de cadeia simples, geralmente constituídos por 15 a 30 bases nucleotídicas obtidas por síntese química. Para amplificar uma determinada região, são necessários dois iniciadores complementares das seqüências que permitem que o fragmento de DNA se amplifique nos seus terminais 3', de modo a permitir a atuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA alvo (Figura 2).

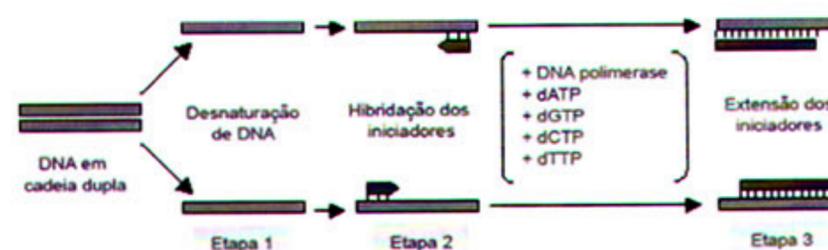


Figura 2 – DNA de dupla hélices separadas por desnaturação, primers homólogos se ligam as suas respectivas partes das fitas de DNA, polimerase coloca base por base copiando a fita de DNA, se na fita de DNA tem um A, a polimerase colocará a base complementar T, assim sucessivamente, formando duas novas fitas. Fonte: www.PCRcurso.com.

Para realizar PCR, são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo, tampão salina contendo a Taq polimerase, oligonucleótidos iniciadores, quatro desoxinucleótidos constituintes do DNA e o cofactor Mg^{2+} . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação.²² O processo envolvendo estes passos pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos). É possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de DNA pré-existente (Figura 3). Em teoria, 25 ciclos de amplificação seguidos aumentam a concentração de DNA em 2^{25} vezes. Na prática, devido a alguma ineficiência no processo de amplificação, esse aumento é em torno de 1.¹²

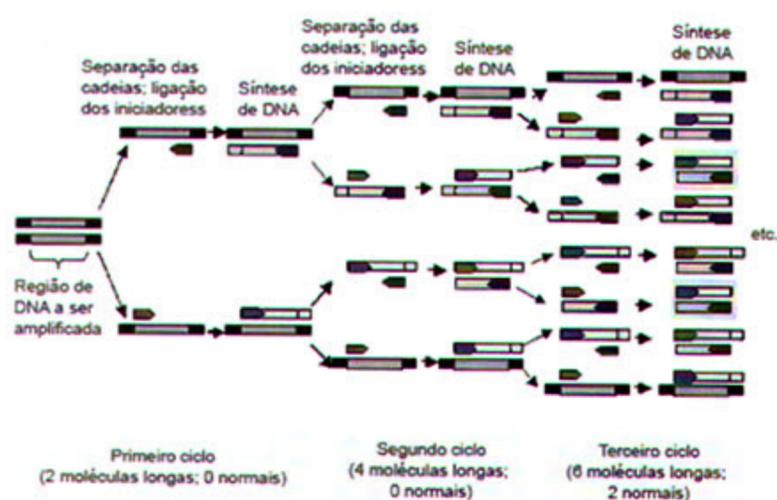


Figura 3 - A figura acima mostra que a fita inicial e a copiada são desnaturadas, cada uma é copiada por sua vez e assim sucessivamente de forma geométrica. Fonte: www.PCRcurso.com.

Como na técnica da PCR se encontram envolvidos vários ciclos de amplificação, foi desenvolvido equipamento que permite programar, de forma contínua e automatizada, os vários ciclos de aquecimento e arrefecimento. Para tal, a enzima DNA polimerase utilizada deverá ser termoestável. Esta foi obtida inicialmente da estirpe termofílica *thermus aquaticus* (TAQ DNA polimerase), que atua a temperaturas elevadas, levando, assim, a um aumento da especificidade da reação. O produto da PCR pode ser visualizado após eletroforese em gel de agarose e seu tamanho ser estimado por comparação com padrões lineares sintéticos, disponíveis comercialmente.

Os tipos de PCR disponíveis são: RT-PCR (reação de transcriptase reversa); *multiplex-PCR*; *Nested-PCR*; *real time PCR*.

IMPORTÂNCIA DA PCR NO DIAGNÓSTICO DA TB NA INFÂNCIA

A técnica de PCR tem se mostrado útil para os diferentes espécimes clínicos de crianças. Entretanto, devido a seu elevado custo, à sua limitada acurácia, complexidade e a não padronização das técnicas de acordo com o espécime utilizado, há variabilidade de sensibilidade e especificidade, o que não permite, ainda, seu uso rotineiro. Em laboratórios de pesquisa, a PCR e hibridização são muito sensíveis e detectam poucos bacilos, como até 10 bacilos no espécime clí-

nico. Estudos demonstram que a AAT, nos espécimes pediátricos, tem utilização limitada. A sensibilidade da PCR em amostras clínicas tem variado de 40% a 60%, em média. Embora baixa, é superior à cultura convencional em LJ^{23,24}. Esta estimativa é diretamente dependente das características da PCR, isto é, *in house* ou sob a forma de *kit* comercial.

Em situações especiais, a PCR tem significativa relevância, como é o caso da *Real-Time PCR* ou o *Nested-PCR* nos aspirados por agulha fina, em linfadenites micobacterianas da criança. Os *primers* e as sondas genéticas permitem o reconhecimento da micobactéria e a diferenciação entre as espécies *M.tb* de *M. avium*, com sensibilidades que variam de 72% a 96% e especificidade de 93% a 100%, resultados superiores a pesquisa de BAAR (15%), cultura (26%) e exame histopatológico (65%).^{25,26}

No líquido pleural, a PCR tem alcançado sensibilidades de até 74%. Estes resultados são promissores em relação a bacterioscopia e cultura, cujas sensibilidades são baixas, em média de 20%. Porém, a PCR não se mostrou melhor que a dosagem da atividade da ADA no líquido pleural. Por outro lado, a PCR associada a outro método rápido (ADA ou contagem de linfócitos) pode alcançar melhor sensibilidade, chegando a 100%.²⁷ Em relação ao exame do líquido céfalo-raquidiano, as diversas modalidades da PCR mostram sensibilidades que variam de 51 a 98% e especificidades, de 90% a 92%. Assim, para situações como a meningoencefalite tuberculosa (MTB), em que o retardo diagnóstico pode levar a um prognóstico reservado, a PCR tem grande aplicabilidade prática. Indica-se sua utilização associada à dosagem da atividade da ADA ou a contagem de linfócitos totais do líquido, visando aumento significativo da sensibilidade e da especificidade.^{27,28}

POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO- RFLP

A técnica de RFLP baseia-se na detecção de polimorfismo de tamanho de fragmentos obtidos pela digestão do DNA por enzimas de restrição, tendo como marcador a seqüência de inserção *IS6110*. É o método de genotipagem mais amplamente utilizado para diferenciação de cepas de *M.tb* e de MNT. Tem se mostrado útil na realização de diferentes tipos de estudos epidemiológicos em cepas isoladas de humanos. A técnica utiliza enzimas de restrição ou endonucleases, que cortam o DNA em múltiplos sítios específicos, mas só cortam uma única vez dentro da *IS6110*. Daí resultam segmentos ou restrição de fragmentos de DNA (RFLP) que variam de acordo com o posicionamento da *IS6110* dentro do genoma. O DNA *fingerprinting* de uma cepa, ou diferentes isolados, será obtido de acordo com o tamanho do número de cópias deste elemento presente no DNA do *M.tb*, será possível construir um mapa de padrão de RFLP das diferentes cepas tipadas. As cepas clusters são definidas por dois ou mais doentes que al-

bergam cepas com o mesmo padrão de *fingerprinting*, quando comparados a um mapa com os padrões de DNA de *M. tuberculosis*. Se os padrões forem os mesmos, sugere a mesma fonte de exposição e contágio.

O conhecimento da dinâmica de transmissão da TB tem melhorado pelo uso destas técnicas de genotipagem que permitem a diferenciação de cepas de *M.tb*.²⁹ Pacientes com TB portadores de cepas de um padrão único são considerados casos de TB por reativação. Os indivíduos cujos isolados compartilham padrões iguais são considerados pertencentes a *clusters* e representam doença decorrente de infecção recente.

Em crianças, o RFLP permite conhecer se a cepa adquirida provém do provável caso índice ou não. Permite, também, identificar, dentre os pacientes com Aids e recorrência de TB, se a recaída se deu pela mesma cepa ou foi devida a novo episódio.³⁰

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

1. ELISA

A técnica de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) foi descrita pela primeira vez por Engval e Perlmann, em 1972.³² É de fácil execução, rápida, de baixo custo e o equipamento necessário já é encontrado em alguns centros de pesquisa da rede pública, em países desenvolvidos e em desenvolvimento. É um método imunoenzimático baseado no reconhecimento da ligação entre os antígenos (ag) e os anticorpos (ac) que, quando fixados a uma fase sólida adsorvente, não perdem a sua atividade imunológica.

Existem dois métodos do ELISA: o indireto e o direto. O ELISA direto usa ac específicos, ligados à superfície sólida para detecção de antígenos circulantes em fluidos corporais.^{32,33}

O ELISA indireto consiste na adsorção do ag específico em suporte sólido, que pode ser de poliestireno, polivinil, nylon ou nitrocelulose, dependendo da natureza do antígeno utilizado. A este suporte é adicionado soro do paciente, para se detectar a presença de anticorpos específicos para o ag. A reação ag-ac formada é revelada por uma segunda reação ag-ac, formada pela adição de anticorpos anti-imunoglobulina humana marcados com enzima. Este complexo é detectado por reação colorimétrica, desenvolvida ao se adicionar ao suporte sólido uma solução contendo substrato da enzima combinada a uma substância corante. O sistema de detecção pode ser de outros dois tipos, além do colorimétrico: fluorescente e luminescente, que, embora sejam mais sensíveis, são mais caros.³⁴ (Figura 4)

A intensidade da cor obtida pelo sistema colorimétrico resulta da adsorção de luz visível, utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda adequado, e é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos produzidos pelo paciente ao determinado ag.

Nas últimas duas décadas, com a caracterização e purificação da parede celular das micobactérias e com a elucidação do genoma do *M.tb*, novos antígenos li-

pídicos ou protéicos purificados recombinantes têm sido empregados em crianças com TB, com resultados promissores. Existem pelo menos dois problemas no paciente pediátrico: a menor carga de anticorpos, em relação ao adolescente e ao adulto, e o fato de que determinados pacientes respondem apenas a um determinado ag e não a outros.

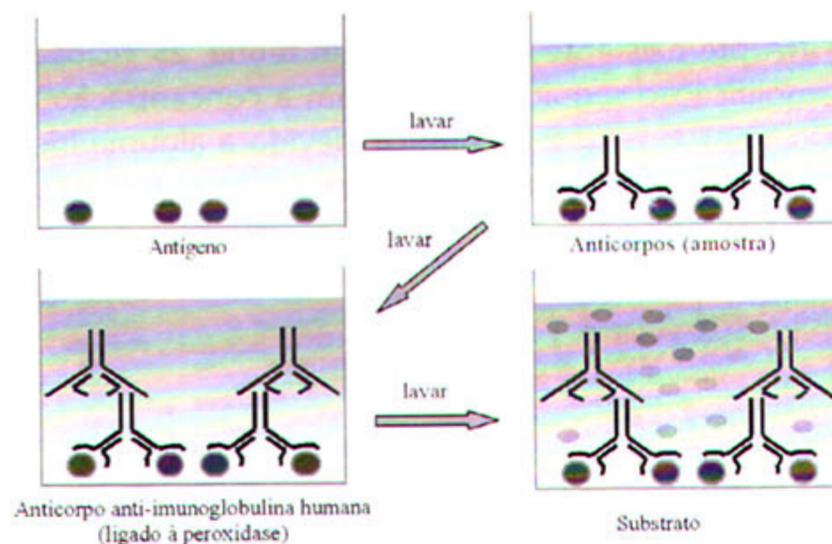


Figura 4 - ELISA indireto: antígeno específico colocado em suporte sólido; adição de soro do paciente; detecção de ac. específico. A reação ag-ac é revelada por outra reação ag-ac formada pela adição de anticorpos anti imunoglobulina humana marcada com enzima. Detecta-se este complexo por reação colorimétrica.

Há consenso que os testes sorológicos devem conter diferentes antígenos específicos e purificados, utilizados de forma combinada, aos pares ou em *coquetel*, para que alcancem elevadas sensibilidades e especificidades.³⁴ Dayal e cols.,³⁵ estudando o ag ESAT-6, alcançaram sensibilidade de 53% com especificidade de 98%, níveis estes superiores à baciloscopia direta e à cultura em meio LJ. Kumar e cols.,³⁶ estudando a combinação de diferentes antígenos em um mesmo teste, alcançaram melhores sensibilidades. Os antígenos ESAT-6 e CFP-10, assim como os antígenos 85 A, B, C, foram utilizados de forma isolada e sob a forma de coquetel. A sensibilidade alcançada foi heterogênea para os diferentes antígenos isoladamente; entretanto, se combinados, chegaram a 67,1%, com especificidade de 80%, demonstrando que a combinação dos antígenos propicia a redução de resposta heterogênea encontrada no diagnóstico sorológico da TB da criança, em regiões onde a TB é endêmica. Martire³⁷, revendo 28 trabalhos de TB em crianças e adolescentes para diagnóstico de TB pulmonar ou extrapulmonar, registrou que as melhores sensibilidades e especificidades, superiores à bacterioscopia e a cultura, foram alcançadas quando os antígenos espécie específicos recombinantes foram combinados ou utilizados sob a forma de coquetel no mesmo poço.

TESTES DE TB FEITO EM BASES IMUNES

1. Atividade da adenosina deaminase - ADA

A ADA é uma enzima encontrada na superfície celular de linfócitos e macrófagos. Cataliza a conversão da enzima em inosina e amônia. Apresenta-se elevada

em regiões de grande proliferação de linfócitos. A dosagem da ADA é um teste simples, de baixo custo, facilmente realizado em qualquer laboratório de médio porte e já disponível em laboratórios de países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Emprega o método colorimétrico de Giusti, baseado na dosagem simples da amônia liberada pela transformação hidrofílica irreversível da adenosina em inosina, catalisada pela enzima. As dosagens são feitas sempre em duplicatas e, se existir discordância, o teste é repetido. Valores de ADA superiores a 38 U/L são considerados positivos e permitem início de tratamento para TB, desde que haja história epidemiológica sugestiva da doença.²⁷

Estudos têm mostrado elevados níveis de ADA em líquidos de peritônio, pericárdio e, principalmente, líquido, em crianças com TB. Os marcadores inflamatórios fornecem informações importantes, visando determinar se a causa, ou não, da infecção é o *M.tb*. A atividade da ADA também parece auxiliar quanto ao prognóstico dos pacientes com meningoencefalite tuberculosa. Aqueles com níveis mais elevados de ADA são os que evoluem com piores seqüelas, em relação aos demais.³⁸

Na TB pleural na infância, a ADA alcança sensibilidade de 88% e especificidade de até 90%.²⁷

A TB peritoneal é uma forma rara e de difícil diagnóstico. Valores de atividade da ADA ≥ 30 U/L, no líquido ascítico, são indicativos de TB.³⁹

2. Testes de Interferon Gama na TB latente

A nova geração de testes rápidos de base imunológica que utiliza sangue para o diagnóstico de TB latente denomina-se IGRAS. Há algumas vantagens em relação a prova tuberculínica, único método diagnóstico de TB infecção, desde sua descoberta por Florence Siebert, na década de 1950.¹⁴

Os IGRAS dependem da resposta do hospedeiro à infecção pelo *M.tb*. Medem a produção de interferon-gama (INF γ) produzida pela resposta de células T aos antígenos específicos do *M.tb*, como o ESAT-6 e o CFP-10. Estes antígenos são transcritos de regiões específicas do genoma do *M.tb*, na qual há ausência dos antígenos do BCG e de outras micobactérias. Existem dois kits comerciais, recentemente aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*): o Quantiferon TB GOLD assay e sua variável, o Quantiferon TB GOLD In-tube (forma recente do quantiferon QTF) e o Elispot-TB assay.⁴⁰

O QTF mede os níveis de INF γ a partir do sobrenadante de um *pool* de células estimuladas do sangue total. O Elispot mede a produção individual de células T, que produzem INF γ a partir de células antigênicas estimuladas uma a uma. Teoricamente, a sensibilidade deste último parece ser maior. Ambos os testes têm controle interno positivo (mitógeno), que demonstra a resposta eficaz de INF γ em imunocompetentes. O mitógeno tem

por objetivo fornecer informações sobre a validade dos testes em indivíduos com *status* imunitário não conhecido, como em menores de dois anos, imunossuprimidos de células TCD4 e infectados pelo HIV.

As principais vantagens seriam: obtenção do diagnóstico, no máximo, em 24 horas, com uma única coleta de sangue na primeira consulta, ausência do efeito *booster* do teste tuberculínico, não interferência do tempo de aplicação da vacina BCG e melhor sensibilidade que a prova tuberculínica. No caso do Quantiferon, as sensibilidades variam de 58% a 80% e do Elispot, de 62% a 93%, com especificidades de 97% e 92%, respectivamente. Porém, considera-se que estas sensibilidades sejam subótimas.⁴⁰ É difícil determinar a sensibilidade do IGRAs, pela falta de padrão ouro para o diagnóstico de TB latente. Faz-se estimativa da sensibilidade, ao se comparar com a prova tuberculínica e a partir de pessoas em contato íntimo com indivíduos com TB doença, visando avaliar o grau de exposição e risco.¹⁴ Alguns estudos em crianças demonstraram que os IGRAs demonstraram melhor sensibilidade no diagnóstico de TB latente que a prova tuberculínica.^{41,42} Assim, IGRAs negativo sugere que não haja risco de adoecimento e permite reduzir o número de crianças recebendo quimioterapia.⁴³ Por outro lado, estudos mostram que IGRAs têm sensibilidade comprometida em crianças desnutridas graves e com níveis de CD4 baixos, em torno de 100 células/mm³.^{44,45} Os testes com INF γ também mostraram-se discordantes da prova tuberculínica em adolescentes e adultos com TB latente no Brasil.⁴⁶

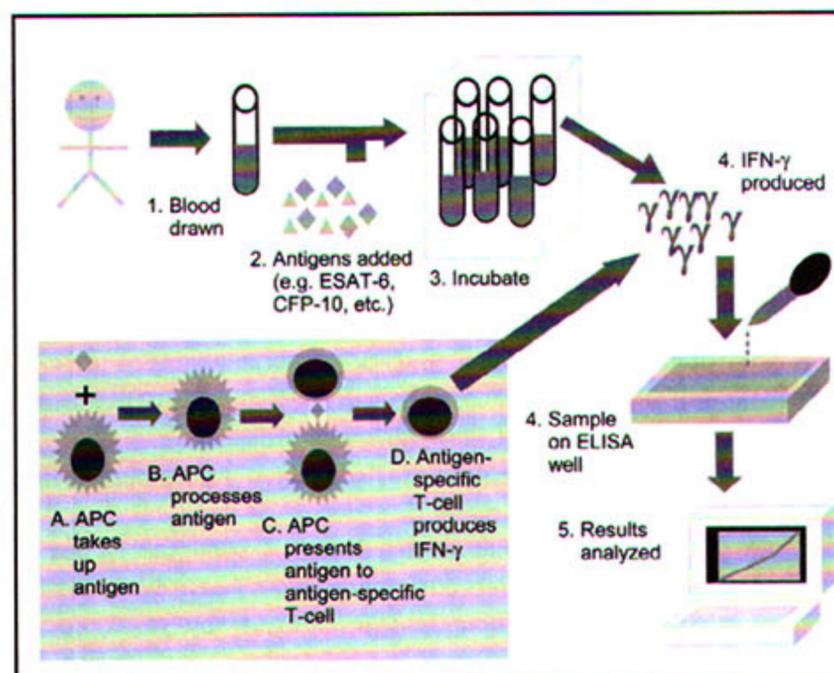


Figura 6 – Técnica do Quantiferon – TB assay – sangue total heparinizado distribuído em três tubos- um sem Ag(salina), outro com os antígenos ESAT6+CFP-10+TB9.7 ou 7.7(depõe do fabricante) e um terceiro com o antígeno mitógeno(ativação celular inespecífica). A seguir incubação. O sobrenadante é recolhido e mensura-se o IFN- γ produzido e liberado no sobrenadante da cultura por ELISA, isto é, anticorpo anti IFN- γ é adsorvido na placa de ELISA; uma alíquota do sobrenadante é adicionado à placa. Adiciona-se a seguir o anticorpo marcado com enzima anti IFN- γ . A reação é revelada pela adição de substrato da enzima contendo corante. A cor desenvolvida apresenta maior intensidade quanto maior for a produção de IFN- γ .

Há necessidade de novos testes *in house* e adição de novos antígenos, para permitir seu uso em nosso meio, principalmente em crianças sob condições especiais (infectadas pelo HIV, desnutridas, vacinadas com BCG há menos de dois anos, em regiões de alta e baixa prevalência de TB). No momento, a maior aplicação dos testes de INF γ talvez seja nas áreas de baixa prevalência de TB.¹⁴

CONCLUSÕES

Dentre os testes em estudo nas últimas décadas, em países em desenvolvimento, a atividade da ADA mostra-se um método de rotina de fácil aplicabilidade para o diagnóstico de TB, com comprometimento de se-rosas, na criança e no adolescente.

As sorologias com os antígenos recombinantes protéicos purificados espécie-específicos do *M.tb*, principalmente MPT-64, ESAT-6, Ag85C e o CFP-10, mostram-

se promissoras, se utilizadas de forma combinada, com sensibilidade semelhante à cultura em meio sólido.

A cultura em MGIT 960 deveria substituir as culturas em meio sólidos, principalmente nos países em desenvolvimento, na detecção de TB em pacientes de alto risco de formas graves e disseminadas.

O MODS necessita de mais estudos em crianças, para verificar o seu real valor em unidades de saúde de poucos recursos, como alternativa em áreas carentes.

Nos pacientes com Aids e TB e recorrência de TB, o RFLP permite identificar recaídas do primeiro episódio de TB ou reinfecções, à medida que os níveis de CD4 caem.

Há necessidade de novos testes *in house* com INF γ e adição de novos antígenos para saber seu real papel, quando comparado a prova tuberculínica, em diversas situações (crianças com TB, vacinadas com BCG, infectadas pelo HIV), nos países em desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children. Geneva: World Health Organization 2008 http://libdoc.who.int/hq/2008/WHO_HTML_TB_2008.
2. Walls T, Shingadia D. Global epidemiology of paediatric tuberculosis. *J Infect*, 2004;48:13-22.
3. Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, Swingler G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet* 2005; 365:130-4.
4. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3:624-32.
5. Alves R, Santanna CC, March MFB, Ormonde LR. Comprovação bacteriológica de tuberculose em crianças como validação de critérios diagnósticos. *Arq Bras Ped* 1995;2:15-21.
6. Fonseca LE, Gontijo Filho PP. Diagnóstico Bacteriológico. In: Sant'Anna CC. Tuberculose na Infância e na Adolescência. São Paulo: Atheneu, 2002. P. 89-94.
7. Martire TM. Métodos Rápidos de Diagnóstico. In: Sant'Anna CC. Tuberculose na Infância e na Adolescência. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 95-109.
8. Starke JR. Pediatric tuberculosis: time for a new approach. *Tuberculosis (Edinb)* 2003;83:208-12.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. FUNASA. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, DF, 2002. 98 p.
10. Marais BJ, Pai M. Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Arch Dis Child* 2007; 92:446-52.
11. Sant'Anna CC. Tuberculose na Infância e Adolescência. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 69-82.
12. Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH et al. Rapid efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1203-8.
13. Arias M, Mellof CQ, Pavona A, Marsico AG, Alvarado-Galvez C et al. Clinical evaluation of the microscopic-observation drug susceptibility assay for detection of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007; 674-680.
14. Lighter J, Mona R. Diagnosing childhood tuberculosis: traditional and innovative modalities. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2009; 39:61-88.
15. Oberhelman RA, Soto Castellares G, Caviedes L, Castillo ME, Kissinger P, Moore DAJ, Evans C, Gilman RH. Improved Recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from children using the Microscopic Observation Drug Susceptibility Method. 2006. *Pediatrics* 2006; 118:100-6.
16. Ejigu GS, Woldeamanuel Y, Shah NS, Gebyehu M, Selassie A, Lemma E. Microscopic-observation drug susceptibility assay provides rapid and reliable identification of MDR-TB. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12:332-7.
17. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A et al. Microscopic-observation drug susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med* 2006; 355:1539-50.
18. Koneman WE, Allen DS. *Mycobacteria Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5a. ed. Philadelphia, Lippincott, 1997.
19. Gray JW. Childhood tuberculosis and its early diagnosis. *Clin Biochem* 2004; 37:450-55.
20. Chan DS, Choy MY, Wang S, Sng LH. An evaluation of the recovery of mycobacteria from urine specimens using the automated Mycobacteria Growth Indicator Tube system (BACTEC MGIT 960). *J Med Microbiol* 2008; 57:1220-2.
21. Dveksler S G, Dieffenbach WC. PCR Primer. A laboratory Manual - 1995 by Cold Spring Harbor Lab. Press.
22. YURYEV A. PCR Primer Design - Methods in Molecular Biology. Nova York, Hardcover, 2007.
23. Gomes-Pestrana D, Torronteras R, Caro P, Anguita MI, Lopez-Barrio AM, Andres A, NAVARRO J. Comparison of Amplicor, in House Polymerase Chain reaction and conventional culture for the diagnosis of tuberculosis in children. *Clin Inf Dis* 2001; 32:17-22.
24. Gomes-Pestrana D. Tuberculosis in children - is PCR the diagnostic solution? *Clin Microbiol Infect* 2002;8:541-4.
25. Van Coppenraet ESB, Lindeboom JA, Prins JM, Peeters MF, Class EC, Kuiper EJ. Real-time PCR assay using fine-needle aspirates and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2644-50.
26. Portillo-Gómez L, Murillo-Neri MV, Gaitan-Mesa J, Sosa-Iglesias EG. Nested polymerase chain reaction in the diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis in mexican children. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:1313-9.
27. Mishra OP, Kumar R, Ali Z, Prasad R, Nath G. Evaluation of polymerase chain reaction and adenosine deaminase assay for the diagnosis of tuberculous effusions in children. *Arch Dis Child* 2006; 91:985-9.
28. Baveja CP, Vidyandhi G, Jain M, Choudhary M, Talukdar B, Sharma V. Newer methods over the conventional diagnostic tests for tuberculous meningitis. Do they really help? *Trop Doctor* 2009;39:18-20.
29. Kim SJ, Bai GH, Kim HJ, Lew WJ, Park YK, Kim Y. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among high school students in

- Korea. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:824-30.
30. Schaaf HS, Krook S, Hollemans DW, Warren RM, Donald PR, Hesselning AC. Recurrent culture-confirmed tuberculosis in human immunodeficiency virus infected children. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24: 685-91.
 31. Engval E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III: quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972;109:129-35.
 32. Crowther JR. The ELISA Guidebook. The International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria, 2001. p. 1-446.
 33. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5a. ed. USA: Saunders-Elsevier, 2003.
 34. Van Oss CJ, Van Regenmortel MHV (Eds.). Immunochimistry. Nova York. Marcel Dekker, 1994.
 35. Dayal R, Sirohi G, Singh MK, Mathur PP, Agarwal BM, Katoch VM, Joshi B, Singh P, Singh HB. Diagnostic value of Elisa serological tests in childhood tuberculosis. *J Trop Pediatr* 2006;52:433-7.
 36. Kumar G, Dagur Pk, Singh M, Yadav VS, Dayal R, Singh HB, Katoch VM, Sengupta U, Joshi B. Diagnostic potential of Ag85C in comparison to various secretory antigens for childhood tuberculosis. *Scand J Immunol* 2008;68:177-83.
 37. Martire TM. Avaliação de um teste imunológico utilizando antígenos proteicos recombinantes MPT64, CFP10 e ESAT 6 para o diagnóstico de tuberculose pulmonar na infância [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008
 38. Jakka S, Veena S, Rao Arm, Eisenhut M. Cerebrospinal fluid Adenosine Deaminase levels and adverse neurological outcome in pediatric tuberculous meningitis. *Infection* 2005;33:264-7.
 39. Blanc P, Perrin I, Barlet L, Talbotec C, Goulet O, Paupe A, Lenclen R, Carbajal R. Peritoneal tuberculosis in children: report of two cases. *Arch Pediatr* 2004;11:822-5.
 40. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med* 2007;146:340-54.
 41. Connell TG, Curtis N, Ranganathans C, Buttery JP. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detection latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in children. *Thorax* 2006;61:616-20.
 42. Dogra S, Narang P, Mendiratta Dk, Chaturvedi P, Reingold AI, Colford JM *et al.* Comparison of a whole blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect* 2007; 54:267-76.
 43. Kampmann B ,Whittaker E, Williams A, Walters S, Gordon A, Martinez-Alier N, Williams B, Crook AM, Hutton AM, Anderson ST. Interferon-gamma release assays do not identify more children with active TB than TST. *Eur Respir J* 2009 feb 5(Epub ahead of print). DOI: 10.1183/09031936.00153408.
 44. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, Deeks J, Pathan AA, Lalvani A. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a t cell based assay : a prospective cohort study. *Lancet* 2004; 364:2196-203.
 45. Brock I, Ruhwald M, Lundgren B, Westh H, Mathiesenlr, Ravn P. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M.tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Pres* 2006;7:56.
 46. Machado Jr A, Emodi K, Takenami I, Finkmoore BC, Barbosa T, Carvalho J, Cavalcanti L, *et al.* Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 446-53.