

EQUIVALÊNCIA DAS REAÇÕES CUTÂNEAS DO PPD ENTRE DOIS PRODUTOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL

AGREEMENT BETWEEN SKIN REACTIONS TO TWO SKIN TESTS COMMERCIALIZED IN BRAZIL

José Veleres Braga

Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/FUNASA/MS

Miguel Aiub Hijjar

Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/FUNASA/MS

Antonio Ruffino Netto

Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária/SPS/MS

Fátima Moreira Martins

Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/FUNASA/MS

Edna Akreman Macedo

Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/FUNASA/MS

Iya Leila de Menezes

Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/FUNASA/MS

Cremilda de Ovídio Medeiros

Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/FUNASA/MS

Resumo

Esta pesquisa objetivou avaliar a equivalência das reações cutâneas do PPD-RT23 Statens Serum Institut e do PPD do Laboratório Pimenta Abreu estimando: (a) a concordância da interpretação qualitativa da reação aos dois testes estudados; (b) a concordância entre os tamanhos das endurações cutâneas provocadas pelos dois produtos e (c) a probabilidade da diferença média ultrapassar 3 milímetros para as medidas dos testes. Os 200 indivíduos estudados eram predominantemente do sexo masculino com idade média de 54 anos. 155 indivíduos eram inscritos na Fundação Leão XXIII sem domicílio fixo e 45 doentes de tuberculose internados no Hospital Ari Parreiras. O coeficiente kappa calculado para três categorias de resposta (não reator, reator fraco e reator forte) foi 3,4%, indicando baixo nível de concordância. A concordância medida para não reatores e reatores revelou um kappa de 5,5%. A comparação dos tamanhos das endurações produziu um coeficiente de correlação intra-classe de 0,247 e um coeficiente de correlação de concordância de Lin de 0,096. Também estimou-se uma probabilidade acima de 91% para que uma diferença qualquer entre as endurações assumia valor maior do que 3 milímetros. As três abordagens analíticas coincidem sobre uma pequena concordância entre os dois produtos.

Palavras-Chave

Teste Tuberculínico; Reprodutibilidade dos Resultados; Tuberculose.

Summary

This study aims to assess the agreement between skin reactions due to the Statens Serum Institut PPD and the Pimenta Abreu Laboratory PPD commercial tuberculin skin tests. Estimates of: a) the qualitative outcome agreement between the products; b) the agreement between quantitative measures of the cutaneous induration due to the tests and c) the probability of the skin measures differences be greater than three millimeters, were obtained. Two hundred subjects mainly men with average age of 54 years were included in the study. Seventy five percent (155) of them were homeless from the Fundação Leão XXIII and twenty five percent (45) were tuberculosis patients from the Hospital Ari Parreiras. The kappa coefficient estimated for three outcome categories (non-reactor, weak reactor and strong reactor) was of 3.4% indicating a low agreement level. The kappa coefficient for non-reactors and reactors was of 5.5%. The comparison analysis for the induration measures yielded an intra-class correlation coefficient of 0.247 and of 0.096 for the Lin's concordance correlation coefficient for agreement. The probability of a three millimeters induration measure difference was above 91%. All these three approaches indicate the same conclusion: a low agreement between these commercial products.

Key Words

Tuberculin Skin Test; Reproducibility of Results; Tuberculosis.

Endereço para correspondência: Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/Fundação Nacional de Saúde, Estrada de Curicica, 2000 - Jacarepaguá - Rio de Janeiro/RJ. Tel.: 21-445-6848. CEP: 22.710-550
E-mail: pesq1@gbl.com.br

Introdução

O teste tuberculínico PPD Rt23 preparado pelo *Statens Serum Institut* (SSI) foi desenvolvido e testado em uma ação conjunta desse instituto e da Organização Mundial de Saúde visando obter um produto padronizado e de alta qualidade que fosse usado em todo o mundo.¹ Entretanto, nos últimos anos, têm surgido na literatura questionamentos quanto a potência desse teste cutâneo como sugerido no trabalho de pesquisadores coreanos.² Segundo argumentos apresentados por Haslov,³ o problema pode ocorrer quando se usam preparações locais a partir da diluição de concentrados da tuberculina Rt23, como ocorreu no exemplo do México.⁴ Nesse caso, o controle de qualidade dessas preparações passou a ser considerada uma questão estratégica.⁵

As estratégias usadas para avaliação da qualidade dos testes tuberculínicos incluem dois aspectos: (a) a avaliação da potência do PPD e (b) a apreciação da equivalência das respostas cutâneas em relação a um produto com potência e características bioquímicas adequadas.

A preocupação com a qualidade do PPD usado nos países da América Latina não é nova. Cabe ao *Instituto Panamericano de Proteccion de Alimentos y Zoonosis* (INPPAZ), Buenos Aires, Argentina, da Organização Panamericana da Saúde, realizar ensaios para avaliar a qualidade deste teste cutâneo.⁶ Porém, independentemente do trabalho dessa instituição, tem-se observado que vários países realizam avaliações dos produtos usados nas suas populações como no México,⁷ Peru⁸ e Brasil.⁹ Os países que se preocupam com a qualidade do PPD Rt23 têm realizado avaliações comparando as reações cutâneas do PPD(SSI) padrão ao de outros produtos^{10,11,12} ou com diferentes formas de administração.¹³

Há pelo menos vinte anos o Brasil vinha preparando a diluição do PPD distribuída em todo o país. Inicialmente, coube ao Instituto de Tisiologia e Pneumologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (ITP/UFRJ) a responsabilidade pela diluição do PPD concentrado¹⁴ e nos anos mais recentes ao Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, da Fundação Nacional de Saúde. Nos últimos anos, não houve aquisição

de novos concentrados do PPD Rt23 devido a mudanças na política de repasse desse insumo pelo *Statens Serum Institut* para os países. Na verdade, o produto já diluído passou a ser vendido no mercado mundial. Essa nova situação tem aumentado a importância do controle de qualidade das preparações do teste tuberculínico hoje comercializadas no país.

O produto comercial PPD de responsabilidade do Laboratório Pimenta Abreu foi oferecido como doação para o Ministério da Saúde para que pudesse ser distribuído um número mínimo de doses, em caráter de emergência, para os Estados brasileiros. Enquanto isso, a Organização Mundial da Saúde tenta uma solução mais definitiva para a distribuição gratuita do PPD. Entretanto, até esse momento, ainda não havia informação disponível sobre a equivalência das reações cutâneas do produto do referido laboratório em relação ao teste produzido pelo SSI.

As estratégias usadas para avaliação da qualidade dos testes tuberculínicos incluem dois aspectos: (a) a avaliação da potência do PPD e (b) a apreciação da equivalência das respostas cutâneas em relação a um produto com potência e características bioquímicas adequadas. Na maioria das vezes, a apreciação das reações cutâneas tem sido privilegiada na avaliação desse produto.¹⁵ Apesar da simplicidade deste tipo de avaliação, alguns autores têm criticado as estratégias mais utilizadas para a análise desses resultados.^{16,17} Um dos mais importantes pesquisadores da área chega a criticar com veemência as opções de análise dos dados desses trabalhos.¹⁸

Esta pesquisa objetivou avaliar a equivalência das reações cutâneas do PPD-RT23 SSI e do PPD do Laboratório Pimenta Abreu estimando: (a) a concordância da interpretação qualitativa da reação aos dois testes tuberculínicos (PPD) estudados; (b) a concordância entre os tamanhos das endurações cutâneas provocadas pelos dois produtos

e (c) a estimativa da probabilidade da diferença média ultrapassar a diferença (máxima aceitável) de 3 milímetros para as medidas relativas aos dois produtos.

Metodologia

Foi conduzido um estudo transversal controlado em indivíduos sadios e doentes de tuberculose em março de 2000. Foram aplicadas as duas apresentações do PPD em cada indivíduo arrolado no estudo. O produto comercial do laboratório Pimenta Abreu foi enviado especificamente para este estudo. De modo semelhante, também o PPD do *Statens Serum Institut* foi comprado do seu representante comercial no Brasil para ser usado nesta investigação.

O PPD-Rt23 SSI apresenta as seguintes características físicas e composição química: líquido injetável incolor tendendo para amarelo muito claro. Contém proteínas (tuberculina PPD RT23) de *Mycobacterium tuberculosis* com concentração de duas unidades de tuberculina. O volume de 1ml da solução de tuberculina contém: Tuberculina PPD RT23 0,4 microg.; Fosfato Dissódico Dihidratado 7,6 mg; Fosfato de Potássio Dihidrogênio 1,5 mg; Cloreto de Sódio 4,8 mg; Sulfato Potássico de Hidroxiquinolina 100microgr.; Polissorbato 80,50 microgr.; Água para injeção q.s.p. 1ml.¹⁹

As especificações do PPD do Laboratório Pimenta Abreu são pouco detalhadas na documentação contida na embalagem comercial. O documento técnico que acompanha o produto apresenta as seguintes informações: Composição – Tuberculina bruta purificada 0,1 = 2 U T. Apresentação: Caixa de isopor contendo 01 frasco com 5 ml = 50 reações (PRONTAS P/ USO). Conservação: Entre 2° e 8°C. As demais informações se referem à técnica de aplicação do teste, leitura e critério de leitura.²⁰

A apresentação do PPD Rt23 SSI disponível para esta pesquisa foi de frasco com 1,5 ml, enquanto o PPD Pimenta

Abreu está acondicionado em frascos de 5 ml. Com o propósito de preparar as apresentações que receberam as codificações desta pesquisa, foram realizados os seguintes procedimentos: (a) autoclavação de oito frascos do tipo penicilina com capacidade de até 10 ml a 120°C por 15 minutos; (b) envasamento de 8 ml do PPD Rt23 em tampa de borracha e selo de alumínio em quatro frascos e 8 ml de PPD Pimenta Abreu em outros quatro frascos e (c) colocação de rótulos de “PPD-A” e “PPD-B”, conforme sorteio para a codificação dos produtos para a pesquisa.

A técnica de aplicação usada consistiu em injetar por via intradérmica 0,1 ml da diluição Rt23 (2 UT) no terço médio da face anterior dos antebraços direito e esquerdo usando seringa especial (tipo tuberculina) com agulha apropriada. Para a injeção da tuberculina, firmou-se o antebraço que foi injetado com a mão esquerda do operador e, com os dedos indicador e polegar, distendeu ligeiramente na direção da agulha e no sentido longitudinal do braço. Essa técnica e a leitura padronizada 72 horas após a aplicação do PPD estão detalhadamente descritas na segunda recomendação da prova tuberculínica da comissão técnica da Campanha Nacional Contra a Tuberculose.²¹

Os produtos foram aplicados nos antebraços direito e esquerdo de acordo com procedimento de alocação randomizada usando-se o aplicativo STATA versão 6.0.²² Cada participante recebeu um número de ordem, usado pelo técnico que aplicou o PPD para identificar qual produto deveria ser aplicado nos antebraços conforme a designação na listagem de randomização para o número correspondente de cada indivíduo. Os leitores das reações cutâneas desconheciam qual dos dois produtos foi aplicado em cada antebraço dos indivíduos estudados para minimizar a possibilidade de viés de aferição. Também a análise dos dados ocorreu antes da quebra desse código.

Os elementos do estudo foram selecionados de dois grupos: (a) indivíduos cadastrados na Unidade de Campo Grande da Fundação Leão XIII, da Secretaria de Ação Social do Governo do Estado do Rio de Janeiro, e (b) pacientes internados com o diagnóstico de tuberculose no Hospital Ari Parreiras, da Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. O protocolo previu a exclusão de indivíduos com doença dermatológica, ou com gesso em pelo menos um dos antebraços, bem como de indivíduos que faltassem ao exame da reação cutânea na data agendada. Todos os participantes concordaram livremente em participar da investigação, após serem informados dos riscos e benefícios decorrentes de sua decisão e assinarem o termo de consentimento. Aos pacientes admitidos no estudo, foi assegurada pelo Centro de Referência Prof. Hélio Fraga a eventual assistência médica decorrente de procedimentos usados na pesquisa, embora nenhum indivíduo dela tenha necessitado. Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da instituição responsável.

Na análise dos dados, quatro medidas foram calculadas: (a) coeficiente *kappa* para a concordância da interpretação qualitativa da reação cutânea para as classificações em três categorias (não reator, reator fraco e reator forte) e para categorias dicotômicas (não reator e reator);²³ (b) coeficiente de correlação intra-classe (CCI)²⁴ e coeficiente de correlação de Lin (CCL)^{25,26} para a concordância entre as medidas em milímetros das reações observadas e (c) o cálculo da probabilidade da diferença média ultrapassar o valor de três milímetros. A interpretação qualitativa das reações cutâneas baseou-se no tamanho da endureção do seguinte modo: (i) Não reator – 0 a 4 milímetros de endureção; (ii) Reator fraco – 5 a 9 milímetros de endureção e (iii) Reator forte – endureção maior ou igual a 10 milímetros. Quando foram consideradas somente duas categorias, reagruparam-se em apenas um os dois grupos de reatores.

Foram considerados indicativos de respostas cutâneas semelhantes os seguintes parâmetros: a concordância da avaliação qualitativa da reação cutânea ao PPD-valores da estimativa pontual coeficiente *kappa* iguais ou superiores a 0,80. Também foram considerados adequados os níveis de concordância correspondentes aos indicadores CCI e CCL estimados em 0,90 e a probabilidade de diferença máxima aceitável de três milímetros igual ou inferior a 0,05.

Resultados

Os 200 indivíduos que participaram da pesquisa eram predominantemente do sexo masculino e tinham idade média de 54 anos, sendo a idade mínima de 17 e a máxima de 82 anos. 155 indivíduos eram inscritos na Fundação Leão XXIII que assiste a população sem domicílio fixo e quarenta e cinco eram pacientes portadores de tuberculose internados no Hospital Ari Parreiras.

A quebra do código revelou que o PPD do *Statens Serum Institut* foi codificado como “PPD-A” enquanto o produto PPD do Pimenta Abreu recebeu o código “PPD-B”. As distribuições das medidas das endureções causadas pelos PPD-A e PPD-B são muito diferentes. A Figura 1 mostra que o perfil da população estudada segundo o “PPD-A” indica que, na maioria, os indivíduos são reatores com predominância de valores acima de 10 milímetros. O perfil dessa mesma população, segundo o “PPD-B”, indica que dois terços desses indivíduos não reagiram a esse teste tuberculínico. Esses perfis díspares parecem indicar que produtos diferentes foram aplicados nos testes cutâneos dessa pesquisa. Ainda que não seja objetivo do estudo dizer se um produto é melhor do que o outro, os perfis devem ser avaliados. O risco de infecção estimado para essa população formada de “moradores de rua” e doentes de tuberculose sugere que o perfil revelado pelo “PPD-A” seja aceito como verdadeiro.

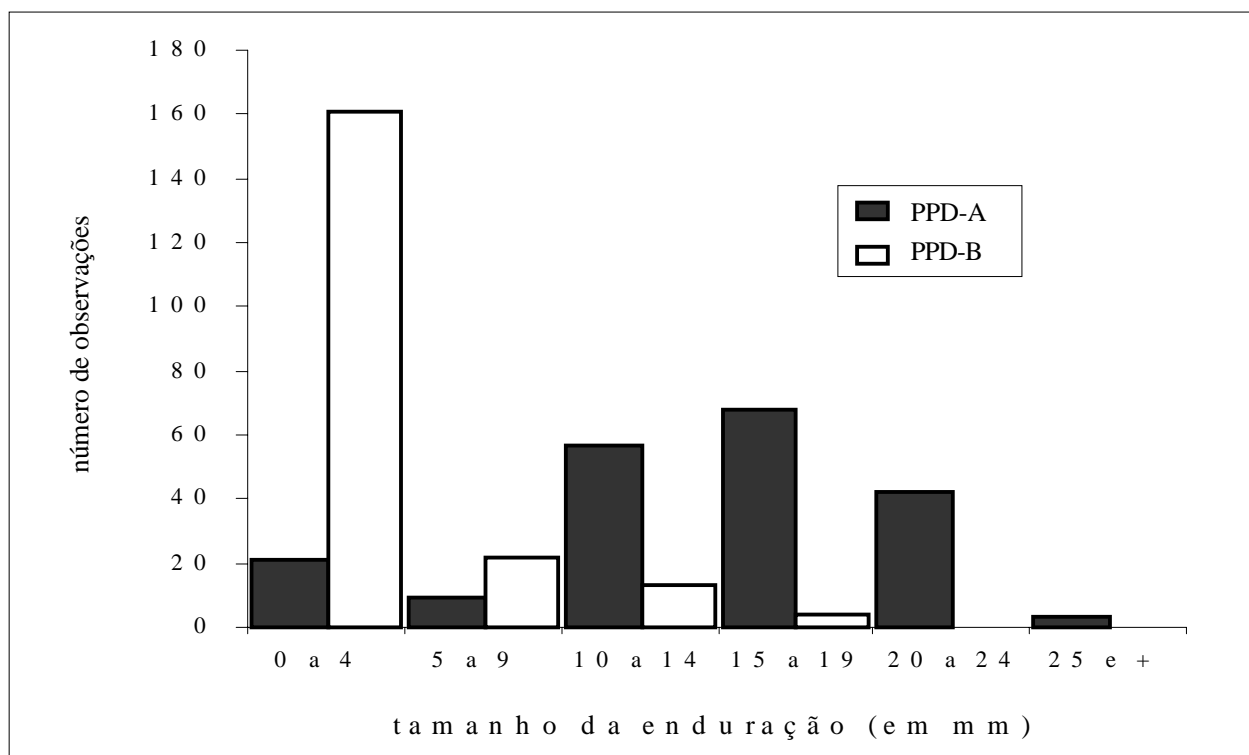


Figura 1 - Distribuição dos tamanhos das reações cutâneas causadas pelos PPD-A e PPD-B.

A interpretação qualitativa das reações cutâneas pelos dois produtos também classificou os indivíduos de modo diferente. Conseqüentemente, a avaliação da concordância entre as classificações dos elementos estudados revelou baixa similitude. As classificações da população amostrada, considerando três e duas categorias de respostas, estão respectivamente apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

O coeficiente *kappa* calculado para as três categorias de resposta (não reator, reator fraco e reator forte) foi de 3,4% indicando nível de concordância muito baixo. De fato, apenas 19%

dos indivíduos tiveram a mesma classificação.

Analisando a interpretação qualitativa dos testes cutâneos baseada em apenas duas categorias (não reator e reator), também observamos uma pobre concordância revelada por uma estimativa de *kappa* igual a 5,5%. Os intervalos de confiança dessas estimativas apresentam limites superiores que não atingem 15%.

A concordância entre os tamanhos das endurações produzidas pelos produtos PPD-A e PPD-B medida pelos coeficientes de correlação intra-classe (CCI) e coeficiente de correlação de

Tabela 1 - Classificação dos indivíduos segundo reações cutâneas ao PPD-A e PPD-B.

		PPD-B			Total
		Não Reator	Reator Fraco	Reator Forte	
PPD-A	Não reator	21	0	0	21
	Reator fraco	9	0	0	9
	Reator forte	131	22	17	170
Total		161	22	17	200

concordância de Lin (CCL) também foi pequena. O valor calculado do CCI foi de 0,247 que é aquém dos níveis que indicam concordância satisfatória entre essas medidas. Por sua vez, a estimativa de concordância do CCL foi de 0,096, corroborando o baixo nível de correspondência entre essas medidas.

Tabela 2 - Classificação dos indivíduos segundo reações cutâneas (duas categorias) ao PPD-A e PPD-B.

		PPD-B		
		Não Reator	Reator	Total
PPD-A	Não reator	21	0	21
	Reator	140	39	179
Total		161	39	200

Uma apreciação visual da distribuição das diferenças entre essas medidas pode ser visto na Figura 2 que contém o gráfico de Bland & Altman. Esta figura revela que ao redor da diferença média de 12,3 milímetros se concentram valores que variam de 2 a 23 milímetros.

A distribuição das diferenças observadas entre as mensurações das reações cutâneas ao PPD-A e PPD-B se assemelha a uma distribuição normal com a maioria dos valores diferentes de zero. Como pode ser visto na Figura 3, a distribuição de Gauss subjacente ao histograma dessa distribuição indica uma probabilidade acima de 91% para que uma diferença qualquer assuma um valor maior do que 3 milímetros.

Discussão

Dois aspectos da metodologia usada nessa investigação merecem comentário. O primeiro refere-se ao fato de os produtos testados nessa investigação terem sido encaminhados pelos próprios laboratórios. Segundo, os procedimentos de randomização da alocação dos produtos nos antebraços dos indivíduos estudados e o cegamento da aferição das endurações cutâneas que foram importantes para evitar a ocorrência de vies de aferição.

As três abordagens analíticas produziram resultados que apontaram para a mesma conclusão, isto é, um

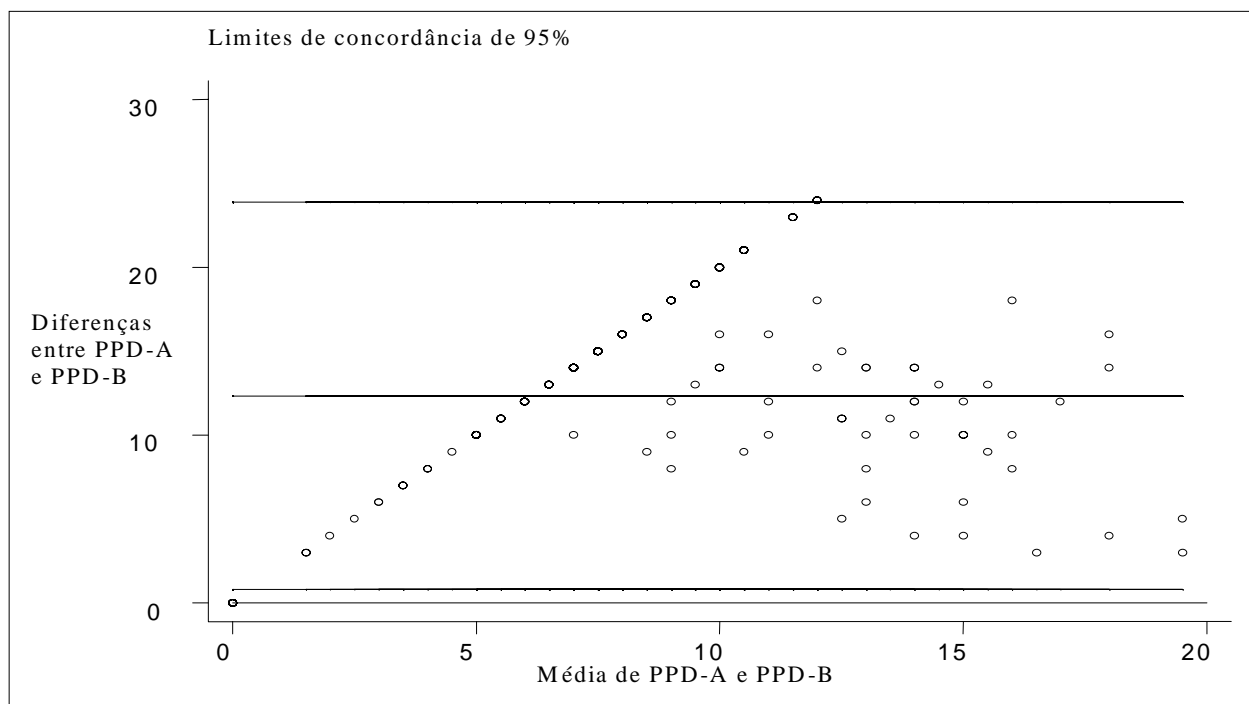


Figura 2 - Gráfico de Bland & Altman com limites de concordância de 95% para as reações cutâneas ao PPD-A e PPD-B.

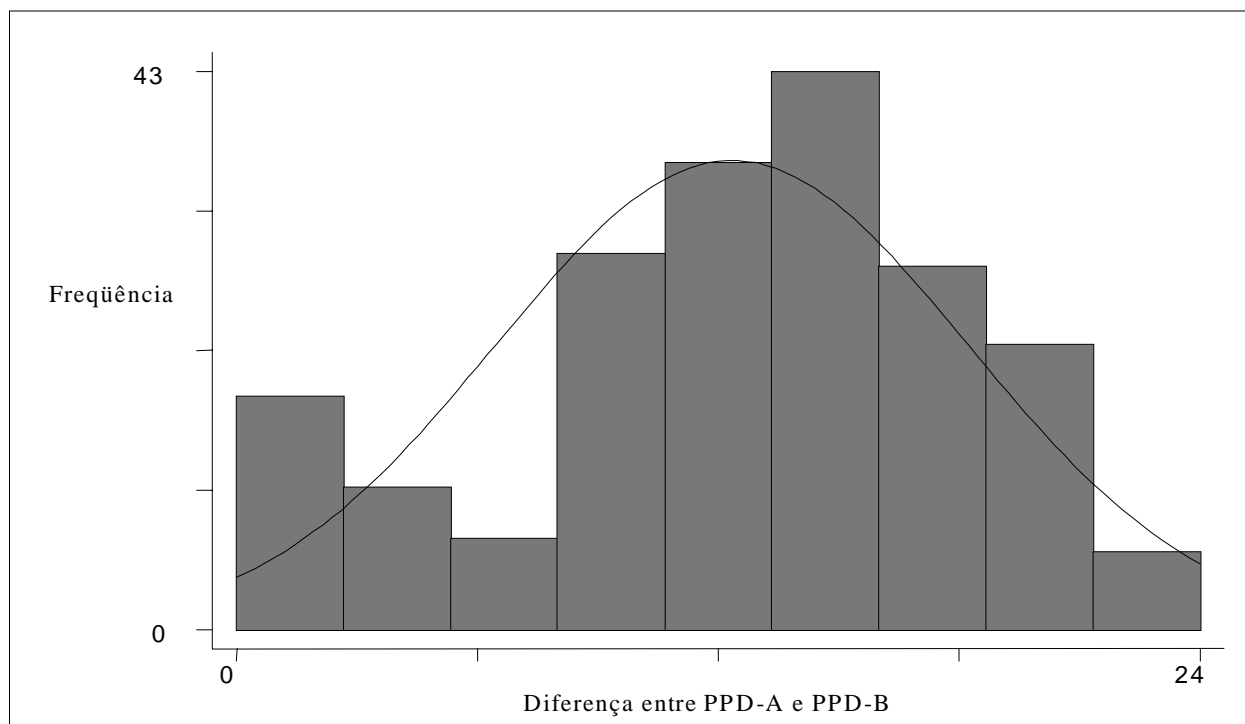


Figura 3 - Distribuição das diferenças (em mm) entre o PPD-A e PPD-B.

inexpressivo nível de concordância entre os efeitos da aplicação dos PPD-A e PPD-B.

Esta única conclusão das análises realizadas implica em uma reflexão sobre a possibilidade de que um dos produtos comerciais estudados apresente composição biológica inadequada ou problemas técnicos no processo de produção, armazenamento e distribuição dos testes cutâneos. Nesse sentido vale a pena considerar os perfis de reação cutânea observados na aplicação desses testes na população estudada. Sob esse ponto de vista, o produto comercial do Laboratório Pimenta Abreu apresentou os resultados menos esperados para a população estudada.

Agradecimentos

Agradecemos à Enfermeira Ivanize de Holanda Cunha pela participação no trabalho de campo desta pesquisa.

Referências bibliográficas

1. Magnusson M, Bentzon M. Preparation of Purified Tuberculin

RT23. Bulletin World Health Organization 1958; 19 : 829-843.

2. Kim SJ, Hong YP, Bai GH, Lee EK, Lew WJ. Tuberculin PPD RT23: has it lost some of its potency? International Journal Tuberculosis Lung Disease 1998; 2 (10) : 857-860.
3. Haslov K, Ponce-de-Leon Rosales S, Rangel-Frausto S, Olesen Larsen S. Tuberculin PPD RT23: still going strong [see comments]. International Journal Tuberculosis Lung Disease 1998; 2 (10) : 793-795.
4. Gamboa J, Rosales R, Morales I. Evaluation of the sensitivity of RT23 purified protein derivivate for determining tuberculin reactivity in a group of health care workers. Clinical Infectious Diseases 1994; 19 : 784-786.
5. Haslov K. Tuberculin PPD RT23 is stable: quality control data cannot be denied [letter]. International Journal Tuberculosis Lung Disease 1998; 2 (11) : 946.

6. De Kantor IG S, Costa A, Garcia V. The quality control of tuberculin PPD products from seven Latin American Laboratories. *Journal Biological Standardization* 1989; 17 : 233-239.
7. Barret J, Hernández A, Ramos I, Martínez E, Magdaleno R, Valdovinos H, et al. Comparative tuberculin reactivity to two protein derivatives. *Revista Investigacion Clinica* 1996; 5 (48) : 377-381.
8. Víctor S, Huanambal L. Reacción tuberculina en niños asegurados menores de un año: comparación de calidad del PPD y dosis de vacuna aplicada. *Revista Médica Instituto Peruano Seguridad Social* 1993; 1/2 (2) : 57-62.
9. Santos J, Macedo E, Miranda J, Ruffino-Netto A. Comparacao entre resultados de provas tuberculínicas feitas com tuberculinas PPD-Rt 23 diluidas no Brasil e na Dinamarca. *Medicina (Ribeirão Preto)* 1981; 1/2 (13) : 26-27.
10. Ussetti P, Urbina J, Pantoja C, Sidne J, Martinez JA, Martinez MA, et al. Tuberculin reactivity in the elderly. Comparison of PPD-RT23 and PPD-CT68. *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica* 1996; 14 (2) : 80-85.
11. Cobelens FG, de Boer HE. [Specificity of the Mantoux-reaction to the new tuberculin RT23 in relation to that of previously used PPD-RIVM; a comparative study in hospital staff (see comments)]. *Nederlands Tijdschrift Geneeskde* 1999; 143 (16) : 855-858.
12. Mansilla C, Palmero K, Palmero D, Ceballos C, Arabehty A, Bado A. Comparacion de la reaccion intradérmica de Mantoux efectuada con dos diferentes productos biológicos. *Revista Argentina Tuberculosis, Enfermedades Pulmonares y Salud Pública* 1984; 3 (45) : 29-36.
13. De Kantor I, Eiras E, Abatte E, Montaner L. Comparacion de las pruebas tuberculínicas de multipuntura e intradérmica de Mantoux, en pacientes tuberculosos. *Revista Argentina Tuberculosis, Enfermedades Pulmonares y Salud Pública* 1981; 1/4 (42) : 75-80.
14. Carneiro A, Andrade G, Becker R, Azevedo L. Teste tuberculínico: diluição padronizada do PPD Rt 23 no Brasil. *Jornal Pneumologia* 1986; 1 (12) : 21-27.
15. Kao AS, Ashford DA, McNeil MM, Warren NG, Good RC. Descriptive profile of tuberculin skin testing programs and laboratory-acquired tuberculosis infections in public health laboratories. *Journal Clinical Microbiology* 1997; 35 (7) : 1847-1851.
16. Strike PW. *Statistical methods in laboratory medicine*. Oxford [England]; Boston: Butterworth-Heinemann; 1991.
17. Jones RG, Payne RB. *Clinical investigation and statistics in laboratory medicine*. London: 1997. ACB Venture Publications.
18. Bartko JJ. Measurement and reliability: statistical thinking considerations. *Schizophrenia Bulletin* 1991; 17 (3) : 483-489.
19. Statens Serum Institut. Tuberculina PPD RT 23 SSI para teste de Mantoux. Copenhagen, Dinamarca: 1998.
20. Reagentes Lapimenta Abreu Ltda. Mantoux - Tuberculina (P.P.D.) pronta p/ uso: 1999; Reagentes Biológicos Pimenta Abreu Ltda.
21. Campanha Nacional Contra a Tuberculose. 2ª. Recomendação sobre o Uso da Prova Tuberculínica em Saúde Pública. Rio de Janeiro; 1970.
22. Stata Corp. *Stata Statistical Software: Release 6.0*. College Station, TX: Stata Corporation, 1999.

23. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. 2d ed. New York: Wiley; 1981.
24. Bartko JJ. The intraclass correlation coefficient as a measure of reliability. Psychological Reports 1966; 19 (1) : 3-11.
25. Lin L, IK. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. Biometrics 1989; 45 : 255-268.
26. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. Statistical Methods Medical Research 1999; 8 (2) : 135-60.