

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

SUMÁRIO

Diagnóstico molecular das infecções do Sistema Nervoso Central pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	131
<i>Marisa Chesky, Rosana Scalco, Luciane Failace, Steven Read & Luiz Fernando Jobim</i>	
Molecular diagnosis of Central Nervous System infections by Polymerase Chain Reaction (PCR)	
Controle de qualidade de Concentrados de Plaquetas (CP)	137
<i>Márcia R. Buchignani, Elenice Deffune, Gislene C. Mastranjo, Maria I.M.C. Pardini, Carlos R. Padovani & Paulo E. A. Machado</i>	
Quality control in Platelet Concentrate (PC)	
Ausência do HBV-DNA por PCR em soros de doadores de sangue com HBsAg negativo e anti-HBc positivo em região de alta prevalência de hepatite B	141
<i>M. A. Largura, M. Pacheco & A. Largura</i>	
Absence of HBV-DNA by PCR in blood donor sera with negative HBsAg and positive anti-HBc from a population with high prevalence of Hepatitis B	
Estudo comparativo entre o método imunológico Prospect e métodos tradicionais para o diagnóstico laboratorial da <i>Entamoeba histolytica</i>	147
<i>Jerolino Lopes Aquino</i>	
Comparative study between the Prospect immunological method and traditional methods for laboratorial diagnostics of <i>Entamoeba histolytica</i>	
Doença Celíaca: uma visão atual	151
<i>Shirley Ramos da Rosa Utiyama & Sérgio Ioshii</i>	
Celiac Disease: an actual vision	
Utilidade da análise de DNA por citometria de fluxo em fluidos da cavidade corporal em comparação com a citologia convencional	155
<i>Carlos Eduardo de Queiroz Lima, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, Yutaka Mizushima & Masanobu Kitagawa</i>	
Utility of DNA flow cytometric analysis of body cavity fluids in comparison with conventional cytology	
Importância do diagnóstico laboratorial das pneumonias bacterianas agudas na infância	159
<i>Maria das Graças Alves Benfica, Isabel Cristina R. Araújo Cardoso, Geraldo Leocádio Filho, Cláudia Braga Vieira & Chequer Buffe Chamone</i>	
Importance of the laboratory diagnosis of acute bacterial pneumonia in childhood	
Importância e dificuldades na quantificação do beta-hCG em pacientes com Doença Trofoblástica Gestacional	161
<i>Elza Maria Hartmann Uberti, Dalin Tedesco Campestrini, Maria do Carmo Fajardo Diestel, Maria Elaine Lacerda, Monica Kruger Ludwig, Giovana Pereira, Cristine Bianchon & Cleber Ricachenevsky</i>	
Difficulties founded in the precise determination of quantitative serum beta-hCG levels in the management of patients with Gestational Trophoblastic Disease	
Estudo comparativo da frequência de marcadores sorológicos em doadores de repetição e primários do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Rio Grande do Norte - HEMONORTE	167
<i>Sandra Rezende de Andrade, Manuel Josué Batista Neto, Telma Cassandra Barros Freire, Isabel Cristina Viana Costa & Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior(MSc)</i>	
Comparative study about the frequency of serological markers in donors of repetition and primary of the Centro de Hematologia e Hemoterapia do Rio Grande do Norte - HEMONORTE	

3

CONTROLE DE QUALIDADE DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS (CP)

Márcia R. Buchignani, Elenice Deffune, Gislene C. Mastranjo, Maria I.M.C.Pardini, Carlos R.

Padovani* e Paulo E. A. Machado.

Hemocentro de Botucatu - HC/FMB - Departamento de Clínica Médica – UNESP -

Botucatu/SP * Departamento de Bioestatística, IB – UNESP

RESUMO

A obtenção de Hemocomponentes lábeis, seu controle e importância na prática hemoterápica tem merecido especial atenção dos profissionais da saúde em todo mundo. Visando a atingir qualidade — programa Hemocentro 2000 — objetivou-se estandardizar a produção de concentrado de plaqueta (CP) que estivesse dentro dos padrões internacionais descritos. Neste sentido, os seguintes parâmetros foram monitorados: 1) calibração sistemática dos equipamentos envolvidos no processo; 2) determinação do tempo ideal de coleta de sangue para produção de CP; 3) escolha do melhor método de determinação de pH, volume e hematimetria. Os resultados obtidos levaram à reformulação dos procedimentos técnicos adotados. Constatou-se que: 1) a instalação do controle de qualidade no serviço gerou certa animosidade que dificultou em parte a obtenção dos dados; 2) na validação do equipamento, concluiu-se que a centrífuga produzida no Brasil não atinge velocidades exigidas pela técnica de calibração, não sendo, portanto, indicada para este fim; 3) foram monitorados diferentes intervalos de tempo, sendo que os CPs produzidos a partir de sangue total colhido em intervalo de tempo inferior a oito minutos, deram os melhores resultados; 4) determinou-se o pH por três diferentes métodos: pHmetro (pHMETER HM-6A®) e aparelho de gasometria NOVA Star Profile Plus 5®. A determinação do pH pelo método de fita, simples, rápido, de baixo custo deu os mesmos resultados dos dois métodos comparativos, sendo indicado seu uso antes da liberação imediata do hemocomponente; 5) após determinação de centrífuga que teve melhor desempenho, definiu-se o melhor técnico, concluindo que este corresponde ao único técnico de nível superior da equipe. Estes resultados, estatisticamente validados, apontam para a indiscutível necessidade do investimento continuado para qualificação de recursos humanos.

PALAVRAS CHAVES

Banco de Sangue, Plaquetas, Controle de Qualidade, Hemocomponentes.

summary

Labile hemocomponents obtaining, its control and importance in homotherapeutic practice has received special attention from health professionals all over the world. In order to reach quality – Hemocenter Program 2000 – it was aimed to standardize the production of platelet concentrate (PC) which was under the described international standards. Therefore, the following parameters were evaluated: 1) sistematic calibration of processing equipments; 2) determination of ideal time for blood collecting for PC production; 3) choosing the best method for pH determination, volume and hematimetry. Obtained results led to reformulation of adopted technical procedures. Its was concluded that: 1) implantation of service quality control raised some hostility which made it somewhat difficult to obtain data; 2) it was concluded, for equipment validation, that Brazilian centrifuging machine did not reach the speed required for technical calibration what made it not reliable for such work; 3) different time intervals were observed and it was concluded that PCs produced from total blood collected in a time interval inferior to 8 minutes showed the best results; 4) pH was determined through 3 different methods: pHmeter (Phmeter hm-6A®), gasometry apparattus NOVA Star Profile Plus 5® and pH determination through thread method which is simple, fast and cheap showed the same results as the two comparetive methods which are indicated to be used before immediate homocomponents liberation; 5) after determination of the best centrifunging it was determined the best technician who is the only one with corresponding university degree in the team. Such results, statistically validated, show a great necessity of a continuous investment on personnel qualification.

KEY WORDS

Blood Banking, Platelets, Quality Control, Hemocomponents

INTRODUÇÃO

A obtenção de Hemocomponentes lábeis, seu controle e importância na prática hemoterápica tem merecido especial atenção dos profissionais da saúde em todo o mundo. No entanto, isto só é possível se houver controles que permitam a validação do produto: reduzindo contaminantes celulares, minimizando os efeitos imunológicos, selecionando produtos compatíveis com o sistema HLA do paciente, garantindo a segurança transfusional, não só através de testes sorológicos, mas também assegurando sua viabilidade e eficácia terapêutica.

Objetivando um programa de qualidade, o Hemocentro de Botucatu elaborou plano de standardização de Concentrado de Plaqueta (CP), desde a elaboração de manuais técnicos, definidos mais recentemente como Procedimentos Operacionais Padrão (POP), lembrando que qualidade deva ser definida como sendo um conjunto de características de um determinado produto ou serviço em satisfazer o usuário, no caso o paciente.

O Setor de Produção de Componentes Lábeis é regido por POPs que devem prever sistematicamente: formação e reciclagem contínua do pessoal; registro adequado e fácil acesso aos dados laboratoriais, mantidos em duplicatas, principalmente nos serviços informatizados; registro do controle térmico dos equipamentos, tais como: banho-maria, *freezer*, geladeira, câmara fria, etc.; garantia de sigilo e proteção de todas as informações registradas; manutenção adequada de equipamentos; inspeção e calibragem periódicas dos equipamentos, devendo os métodos utilizados ser monitorados; segurança do produto obtido, controlado e liberado para uso terapêutico; produto de acordo com as especificações técnicas, previstas nos manuais internos; produto rejeitado (fora das normas) pelo CQ, eliminado do uso terapêutico. É preciso que, através das normas, se preveja(m) o(s) problema(s) e se lhes remova a causa básica; manuseio, armazenamento e embalagem adequados, sem danificação para o produto; *feedback* preciso, através da apresentação e discussão dos resultados do CQ, pelos chefes de setores e direção geral; adequada documentação sobre todos os resultados de controle dos produtos; motivação do trabalho técnico, para garantir-se a segurança do produto, explicando-se por que os procedimentos de controle são necessários; auditoria(s) do(s) processo(s) para se determinar se estão sendo efetuadas verificações apropriadas, exigidas legalmente, e se os produtos aceitos ou rejeitados são monitorados durante todo o processo de obtenção; planejamento e execução de novas técnicas de controle, avaliando-se os seus resultados e validando-as, para instituí-las na rotina do controle.

Os CPs, obtidos por citocentrifugação da bolsa de sangue total tripla, cujo plástico é para conservação de plaquetas durante 5 dias (Calhoun,1996) (ASEM® , HEMOBAG® , BAXTER®) foram controlados nos parâmetros classicamente definidos, como: volume, temperatura de estoque e condição de armazenamento (Katz et al, 1976). Atualmente, em determinados serviços, são realizados controles de qualidade extremamente rigorosos, chegando-se, inclusive, a avaliar a forma , densidade das plaquetas, testes de recuperação *in vivo*, além da avaliação microbiológica (Arpi et al,1993; Murphy et al,1994 ; Sazama,1994), testes não realizados neste trabalho.

Objetivou-se: estabelecer um programa de calibração sistemática de equipamentos; ajustar as centrífugas para a obtenção específica de CP; estabelecer parâmetros rígidos de controle dos CPs, baseados inicialmente em: constatação do seguimento do manual existente, determinação de volume, pH e hematimetria; controlar e avaliar o tempo de coleta que resulta em hemocomponente de melhor qualidade; estabelecer as diferenças qualitativas entre os técnicos do setor; promover, através de formação continuada, readequação e atualização técnicas, baseadas nas dificuldades diagnosticadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 504 CP *standard* no dia 1 (D1) da preparação num período de sete meses, durante os quais se padronizaram as centrífugas a serem utilizadas na realização do CP, em função dos seus respectivos raios. Segundo Cavalier e a AABB, o sangue total deve ser submetido a uma centrifugação de 2000 g, durante 3 minutos, e o plasma rico em plaquetas (PRP), a uma centrifugação de 5000 g, durante 5 minutos. Aplicando-se a fórmula: $rcf = 0.00001118 \cdot R \cdot N^2$, onde *rcf* = *relative centrifugal force*, R = raio da centrífuga em cm, N = rotação por minuto.

Uma vez padronizada esta fórmula foram identificadas como C1 = FANEN F22®, com raio de 20,3 cm e C2 = MLW Eletronic K 80®, com raio de 26,83 cm, a qual foi anotada pelo técnico no momento da separação do hemocomponente juntamente com sua rubrica. Através desta, os três técnicos foram identificados como técn. 1, técn. 2 e técn. 3, posteriormente.

Com o intuito de se comprovar a influência do tempo de coleta, na qualidade numérica e funcional dos CPs, segundo dados de publicações, optou-se pela cronometragem da coleta (Reiss & Katz, 1976). Mondaine Stop Watch® e os tempos de coleta foram divididos em intervalos. Sendo o T1 ≤ 5 minutos; o T2 = 5 6; T3 = 6 7; T4 = 7 8; T5 = 8 12.

Os parâmetros controlados foram volume, pH por três diferentes métodos: pH1 em pHmetro pH METER HM-6A®, pH2 em fita Merck®, pH3 em aparelho de gasometria NOVA Star Profile Plus 5®, contagem plaquetária no aparelho Coulter T-890®, cujo valor final se obteve em função do volume do CP obtido.

O método estatístico aplicado utiliza medidas da centralidade e da variabilidade dos dados (Padovani, 1991; 1995) e posteriormente, com a construção dos limites de confiança, para a resposta média, assim como com composições de interesse entre tempo, técnico e centrífuga.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os controles envolveriam a qualidade da formação de recursos humanos, equipamentos, metodologias utilizadas e avaliação dos controles existentes. Spackman & Beck, em 1990, publicaram um trabalho a respeito do monitoramento dos recursos humanos e da verificação da qualidade de componentes sanguíneos, correlacionando-os com os possíveis efeitos deletérios que produtos não controlados provocam nos pacientes (Aster, 1995).

As primeiras constatações foram a indisposição e o desconforto, ocorridos dentro do setor de produção de componentes lábeis, pois as pessoas, apesar da clara exposição de motivos feita previamente, sentiam-se mal, por estarem sendo observadas, e muito mais desconfortável ainda, pelo fato de seu trabalho estar sendo monitorado. Isto criou, por determinado tempo, oposição ao controle. Esta é uma posição extremamente preocupante, pois, segundo Arnold, um projeto de qualidade não pode limitar as pessoas, vestir na equipe uma camisa de força, mas sim proporcionar-lhes maior rendimento e melhor entrosamento nas atividades realizadas.

Os resultados dos testes realizados foram comparados com os definidos internacionalmente, para CP *standard*: $\geq 5,5 \times 10^{10}$ plaquetas por unidade, pH de 6,4 a 7,4 e volume de 45 a 60 ml (Cavalier, 1987; AABB, 1990; Brozovic et al, 1992; Stivala & Wagstaff, 1994). Todas as conclusões foram discutidas no nível de 5% de significância, sendo que o respectivo intervalo de confiança corresponde à confiabilidade de 95%.

Após o estudo individual de todos os dados, elegeram-se como tempos ideais os codificados como T1 e T3, que correspondem, respectivamente, ao sangue coletado num período ≤ 5 minutos e entre 6,1 e 7 minutos, inclusive. Esta decisão baseou-se no julgamento da contagem plaquetária e na determinação do pH dos CPs, obtidos nas duas centrífugas, em função dos três técnicos (tabelas 1, e 2). Estes resultados

confirmam o que Cavalier, em 1987, já constatou que sangue coletado com tempo superior a 12 minutos é considerado inadequado para a produção de plaquetas. Estes autores baseiam-se no fato de que sangue coletado lentamente propicia a formação de microcoágulos, o que determina a baixa da qualidade dos CPs.

Objetivando-se avaliar as condições técnicas de cada profissional, consideraram-se: o resultado da variável volume nos produtos (cabe lembrar que o volume de plasma residual depende, quase que exclusivamente, do técnico manipulador) e os resultados hematimétricos.

Conclui-se que o profissional, codificado como Técn. 3, o único com nível superior, foi o que obteve melhor desempenho. O Técn. 1 obteve resultados desfavoráveis, nos diferentes parâmetros estudados, mas foi o volume o determinante dos maiores erros. Os resultados do Técn. 2, no global, foram inferiores aos do eleito como o melhor.

Na validação das centrífugas ocorreram dificuldades iniciais, as quais se baseiam no fato de que a centrífuga FANEM F22® não atinge a velocidade necessária para a centrifugação. Como se trata de um equipamento nacional, largamente utilizado para esse fim, adaptou-se a rotação, na segunda fase, para 3600rpm, durante 10 minutos; embora os cálculos exigissem uma velocidade de 4693rpm.

Para a avaliação dos resultados que elegeram a centrífuga que atingiu os objetivos de qualidade internacionalmente, levaram-se em consideração: o melhor intervalo de tempo (junção de T1 e T3) e o técnico de melhor desempenho.

A tabela 3 é uma apresentação resumida dos resultados comparativos das duas centrífugas estudadas. Os dados hematimétricos são evidentes. A centrífuga FANEM F22® não permite a obtenção de CPs, dentro dos padrões de qualidade estabelecidos. A constatação de que se obtém como limite inferior $1,66 \times 10^{10}$ e limite superior $2,6 \times 10^{10}$, para um valor esperado superior ou igual a $5,5 \times 10^{10}$, mostra sua inadequação. Para se obter o mesmo efeito terapêutico nos pacientes, seria necessário transfundir, no mínimo, 2,7 vezes mais hemocomponentes. Inúmeras são as conseqüências deste ato: aumento dos riscos imunológicos (Grijnhout, 1994; Mollison, 1989) e infecciosos (Genetet, 1990) para os pacientes.

O volume, aceito pela maioria dos autores como ideal, varia entre 45-60 ml, sendo histórica a importância da conservação das plaquetas, Holme, em 1994, publicou que volumes de plasma aumentam os riscos de diminuir o pH e também os da ativação da plaquetas.

Para o pH não foram detectados valores fora do padrão pelos três diferentes métodos, utilizados neste estudo, assim como não foram observadas interferências, quer das centrífugas, quer dos técnicos. Constatou-se que a fita Merck®, empregada para a determinação rápida do pH, é um instrumento fidedigno, podendo ser utilizada na prática para este fim, antes da liberação da bolsa de CP ao paciente. Alguns pesquisadores acreditam que a função plaquetária está prejudicada em níveis de pH entre 6,0 e 6,5 (Pisciotta, 1991). Por isso, determinou-se que, para este trabalho são aceitas como plaquetas adequadas para a transfusão aquelas com pH entre 6,4 e 7,4.

Com os resultados hematimétricos, podemos constatar que os técnicos influenciam diretamente na qualidade do produto final, porque são os manipuladores. Quando estão irritados e agitados, interferem diretamente na qualidade final dos CPs.

O figura 1 mostra a interferência das centrífugas na contagem plaquetária, sendo este um indicador essencial da qualidade dos produtos (Mcshine et al, 1991). Isto é extremamente preocupante, pois o único fabricante nacional de centrífugas refrigeradas, e que domina o mercado interno, coloca à disposição dos Centros de Transfusão Sangüíneas no Brasil equipamentos que não atingem os objetivos. Isto leva, sem dúvida, a um prejuízo terapêutico clínico ao paciente, através de ineficácia transfusional, acarretando um número maior de transfusões com conseqüente aumento dos riscos infecciosos e imunológicos, embutidos em toda transfusão. Além destes fatos, há a conseqüência econômica que gera aumento de faturamento ao Sistema Único de Saúde, sem representar melhora do atendimento ao paciente.

CONCLUSÕES

- ➡ É importante o monitoramento do tempo de coleta para a obtenção de bons CPs.
- ➡ Sugere-se que sejam realizados CPs, somente nas unidades de sangue, coletado num tempo inferior ou igual a 8 minutos.
- ➡ É obrigatório o controle de qualidade dos produtos a serem transfundidos.
- ➡ A formação contínua, a reciclagem e a qualificação pessoal é um importante item na obtenção de hemocomponentes de qualidade.
- ➡ Hemocomponentes de qualidade esperada só foram obtidos por técnicos de nível superior.
- ➡ A determinação de pH por fita é um método seguro para a finalidade à qual se destina.
- ➡ Deve-se determinar, sistematicamente, o pH de todo CP, antes da sua imediata liberação.
- ➡ A centrífuga FANEN F22® não deve ser utilizada com a finalidade de obtenção de CPs.

Referências Bibliográficas

- AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. **Technical manual**. 10.ed. Arlington, 1990. p.48,49,637-41.
- ARNOLD, k. L. **O guia gerencial para o ISO 9000**. Rio de Janeiro: Campus, 1994, 400p.
- ARPI, M et al. A novel screening method for the detection of microbial contamination of platelet concentrates. **Vox Sang.**, v.65, p.335-6, 1993.
- ASTER, R. H. What makes platelets go ? the cloning of thrombopoietin. **Transfusion**, v.35, p.1, 1995.
- BROZOVIC, B., SEGATCHIAN, M. J., MCSHINE, R. L. The use of mean platelet volume for evaluation of quality of platelet concentrates. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, v.3, p.629-31, 1992.
- CALHOUN, L Blood product preparation and administration. In: PETZ, L. D. et al. **Clinical practice for blood transfusion**. New York: Churchill Livingstone, 1996, p.305-33.
- CAVALIER, J. **Preparation, controle de qualité et conservation des concentrés de plaquettes et de granulocytes à usage clinique** , Paris:Ints, 1987. 44p.
- GENETET, B., ANDREU, G.,BIDET, J-M. **Aide memoire de transfusion**. Paris: Editora Flammarion, 1990, p.243-50.
- GRIJZENHOUT, M. A. et al. UVB Irradiation of human platelet concentrates does not prevent HLA alloimmunization in recipients. **Blood**, v. 84, p.3524-31, 1994.
- HOLME, S.,HEATON, W. A., MOROFF, G. Evaluation of platelet concentrates stored for 5 days with reduced plasma volume. **Transfusion**, v.34, p.39-43, 1994.
- KAHS, R. A., COSSETTE, I., FRIENDMAS, L. I. Optimum centrifugation conditions for the preparation of platelet and plasma products. **Transfusion**, v.16, p.162-5, 1976.
- MCSHINE, R. L.et al. Effect of EDTA on platelet count and other platelet parameters in blood and blood components collected with CPDA - 1.**Vox Sang.**, v.61, p.84-9,1991.
- MOLLISON, P.L. **Blood transfusion in clinical medicine**. London: Blackwell, 1989, p.84-144
- MURPHY, S et al. In vitro assessment of quality of stored platelet concentrates. **Transfus. Med. Rev.**, v.8, p.29-36, 1994.
- PADOVANI, C. R. Estatística na metodologia da investigação científica. **USC Bol. Cult.**. v.9, p. 1-22, 1991.

PADOVANI, C. R. Noções básicas de bioestatística. In: CAMPANA, A. O. **Introdução à investigação clínica**. São Paulo: Trianon, 1995. p. 111-42.

PISCIOTTO et al. In Vitro characteristics of volume-reduced platelet concentrate stored in syringes. **Transfusion**, v.31, p.404-8, 1991

REISS, R. F., KATZ, A. J. Optimizing recovery of platelets in platelet rich plasma by the simplex strategy. **Transfusion**, v.4, p.370-4, 1976.

SAZAMA, K. Bacteria in blood for transfusion. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.118, p.350-64, 1994.

SPACKMAN, K. A. , BECK, J. R. A. Knowledge-based system for transfusion advice. **An. J. Clin. Pathol.**, v.94, Suppl 1, p.525-9, 1990.

STIVALA, J. F. A., WAGSTAFF, W. Quality assurance in blood transfusion. **Vox Sang.**, v.67, Suppl 5, p.37-42, 1994.

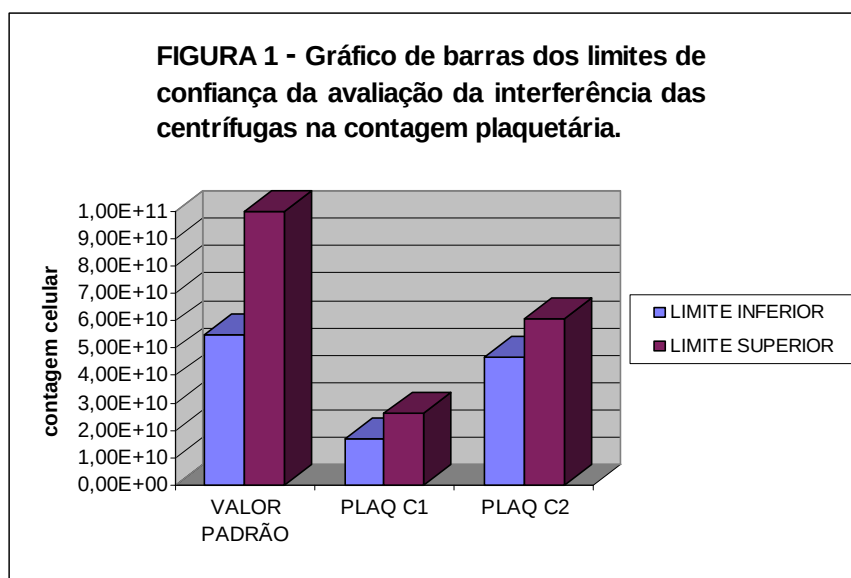


Tabela 1 - Diferentes parâmetros controlados nos concentrados de plaquetas para centrifuga 1

Lim. de Confiança	tempo	Técnico	Glob. brancos	Glob. Vermelhos	Linfócitos	Plaquetas	Volume	pH1 ⁽²⁾	pH2 ⁽³⁾	pH3 ⁽⁴⁾
Inferior	1	Téc. 1	8,465E+05	1,697E+08	3,395E+06	3,913E+10	16,972	7,339	6,847	7,021
Superior	1	Téc. 1	3,087E+06	1,030E+09	2,061E+07	9,109E+10	103,028	7,627	7,419	7,453
Inferior	2	Téc. 1	2,995E+07	1,848E+08	1,155E+07	3,642E+09	49,803	7,397	7,038	7,164
Superior	2	Téc. 1	3,867E+07	1,063E+09	5,842E+07	3,660E+10	63,947	7,579	7,212	7,33
Inferior	3	Téc. 1	1,656E+06	4,906E+08	1,037E+07	1,773E+10	46,684	7,377	7,005	7,19
Superior	3	Téc. 1	3,212E+06	1,242E+09	1,966E+07	3,445E+10	59,316	7,541	7,141	7,264
Inferior	4	Téc. 1	4,073E+05	5,076E+08	2,201E+06	4,183E+09	41,532	7,249	6,891	7,14
Superior	4	Téc. 1	6,112E+06	1,793E+09	4,630E+07	4,664E+10	46,968	7,577	7,209	7,366
Inferior	5	Téc. 1	1,936E+06	4,050E+08	7,536E+06	1,412E+10	47,651	7,373	7,071	7,238
Superior	5	Téc. 1	2,142E+06	8,050E+08	1,528E+10	2,950E+10	59,549	7,487	7,209	7,302
Inferior	1	Téc. 2	9,769E+05	3,174E+08	7,048E+06	1,867E+10	47,138	7,231	7,018	7,169
Superior	1	Téc. 2	2,943E+06	8,359E+08	2,120E+07	4,503E+10	52,028	7,531	7,148	7,301
Inferior	2	Téc. 2	1,728E+06	4,077E+08	1,083E+07	1,869E+10	46,971	7,253	6,969	7,141
Superior	2	Téc. 2	3,787E+06	1,178E+09	2,492E+07	4,532E+10	54,887	7,537	7,131	7,323
Inferior	3	Téc. 2	1,149E+06	1,949E+07	7,114E+06	4,927E+09	47,707	7,17	7,088	7,286
Superior	3	Téc. 2	2,037E+06	4,272E+08	1,155E+07	1,975E+10	51,627	7,796	7,224	7,358
Inferior	4	Téc. 2	1,166E+06	9,627E+07	6,734E+06	6,637E+09	46,404	7,209	6,966	7,129
Superior	4	Téc. 2	2,779E+06	7,409E+08	2,012E+07	4,224E+10	51,024	7,667	7,148	7,371
Inferior	5	Téc. 2	1,307E+06	4,569E+07	8,079E+06	1,051E+10	44,679	7,442	7,072	7,256
Superior	5	Téc. 2	2,529E+06	5,115E+08	1,655E+07	2,639E+10	57,321	7,546	7,186	7,316
Inferior	1	Téc. 3	3,189E+06	2,302E+08	8,479E+06	2,525E+10	48,52	7,45	7,056	7,241
Superior	1	Téc. 3	3,571E+06	8,010E+08	3,465E+07	2,639E+10	55,924	7,45	7,21	7,309
Inferior	2	Téc. 3	1,887E+06	3,373E+08	1,166E+07	1,796E+10	52,249	7,412	6,813	7,258
Superior	2	Téc. 3	3,622E+06	6,764E+08	2,526E+07	2,920E+10	55,501	7,612	7,537	7,29
Inferior	3	Téc. 3	1,402E+06	7,634E+07	8,505E+06	1,080E+10	50,943	7,327	7,052	7,237
Superior	3	Téc. 3	3,546E+06	5,703E+08	1,948E+07	2,506E+10	57,891	7,613	7,182	7,291
Inferior	4	Téc. 3	3,513E+05	3,420E+08	7,413E+06	1,357E+10	51,336	7,339	7,03	7,248
Superior	4	Téc. 3	8,278E+06	8,980E+08	3,392E+07	2,533E+10	59,998	7,627	7,192	7,3
Inferior	5	Téc. 3	1,095E+06	1,397E+08	5,782E+06	9,958E+09	48,608	7,374	7,015	6,987
Superior	5	Téc. 3	2,158E+06	6,232E+08	1,528E+07	2,936E+10	65,392	7,526	7,213	7,541
VALOR PADRÃO			<0,2E+09	<1E+09	<6,5E+08	≥5,5E+10	45-60 ml	6,4-7,4	6,4-7,4	6,4-7,4

(1)Tempo = 1,2,3,4 e 5 correspondem aos intervalos definidos; (2) pH1 = determinação por aparelho pHmetro, pH METER modelo HM-6A®; (3) pH2 = determinação do pHpor fita de pHmarca Merck® referência 9557, destinada a medir pH variável de 6,4-8,0;(4) pH3 = determinaçodo pH por aparelho de gasometria venosa NOVA Star Profile Plus5® do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário/FMB.

Tabela 2 - Diferentes parâmetros controlados nos concentrados de plaquetas para centrifuga

Lim. de Confiança	tempo	Técnico	Glob. brancos	Glob. Vermelhos	Linfócitos	Plaquetas	Volume	pH1 ⁽²⁾	pH2 ⁽³⁾	pH3 ⁽⁴⁾
Inferior	1	Téc. 1	2,167E+06	3,311E+08	1,318+07	2,301+10	40,954	7,177	6,937	7,013
Superior	1	Téc. 1	6,495E+06	2,309E+09	4,102E+07	5,008E+10	50,446	7,543	7,163	7,297
Inferior	2	Téc. 1	2,228E+06	8,919E+08	1,513E+07	3,826E+10	47,948	7,216	7,029	7,07
Superior	2	Téc. 1	3,697E+06	1,490E+09	2,739E+07	5,286E+10	54,718	7,372	7,127	7,188
Inferior	3	Téc. 1	2,893E+06	8,824E+08	1,984E+07	3,380E+10	46,238	7,21	6,979	7,052
Superior	3	Téc. 1	6,257E+06	1,609E+09	4,961E+07	5,338E+10	53,688	7,43	7,081	7,216
Inferior	4	Téc. 1	1,791E+06	6,079E+08	1,198E+07	3,096E+10	43,857	7,141	6,939	6,981
Superior	4	Téc. 1	4,569E+06	2,132E+09	3,473E+07	5,968E+10	51,779	7,459	7,207	7,241
Inferior	5	Téc. 1	2,211E+06	6,475E+08	1,275E+07	2,415E+10	47,416	7,274	6,985	7,11
Superior	5	Téc. 1	4,745E+06	1,364E+09	3,208E+07	4,531E+10	53,046	7,476	7,115	7,242
Inferior	1	Téc. 2	2,182E+06	4,328E+08	1,309E+07	2,054E+10	46,523	7,43	7,053	7,223
Superior	1	Téc. 2	3,304E+06	9,111E+08	2,168E+07	3,396E+10	49,283	7,586	7,127	7,293
Inferior	2	Téc. 2	1,877E+06	4,928E+08	1,776E+07	2,248E+10	44,66	7,351	7,034	7,207
Superior	2	Téc. 2	3,386E+06	9,184E+08	1,888E+07	3,376E+10	47,902	7,503	7,148	7,285
Inferior	3	Téc. 2	2,222E+06	4,656E+08	1,497E+07	2,258E+10	45,87	7,192	6,995	7,132
Superior	3	Téc. 2	4,944E+06	1,299E+09	3,346E+07	4,376E+10	51,506	7,542	7,181	7,314
Inferior	4	Téc. 2	1,566E+06	5,375E+08	9,371E+06	1,955E+10	45,043	7,366	7,004	7,181
Superior	4	Téc. 2	2,576E+06	9,603E+08	1,708E+07	3,737E+10	49,845	7,522	7,14	7,299
Inferior	5	Téc. 2	1,753E+06	4,505E+08	1,113E+07	1,786E+10	46,777	7,391	7,035	7,201
Superior	5	Téc. 2	3,492E+06	8,957E+08	2,348E+07	3,396E+10	50,483	7,497	7,135	7,279
Inferior	1	Téc. 3	3,001E+06	6,739E+08	2,182E+07	4,409E+10	50,308	7,201	6,981	7,015
Superior	1	Téc. 3	5,888E+06	2,671E+09	4,200E+07	6,067E+10	54,854	7,39	7,103	7,155
Inferior	2	Téc. 3	2,941E+06	9,093E+08	2,202E+07	4,502E+10	51,568	7,151	6,972	7,018
Superior	2	Téc. 3	5,214E+06	1,544E+09	3,997E+07	6,570E+10	55,698	7,375	7,094	7,164
Inferior	3	Téc. 3	3,142E+06	9,992E+08	2,215E+07	4,364E+10	50,403	7,167	7,016	7,045
Superior	3	Téc. 3	5,002E+06	1,695E+09	3,624E+07	6,620E+10	54,507	7,361	7,124	7,179
Inferior	4	Téc. 3	3,059E+06	7,828E+08	1,977E+07	4,079E+10	50,274	7,227	7,064	7,047
Superior	4	Téc. 3	6,173E+06	2,689E+09	4,858E+07	6,039E+10	56,26	7,403	7,176	7,213
Inferior	5	Téc. 3	2,259E+06	5,356E+08	1,472E+07	2,943E+10	50,09	7,301	7,062	7,158
Superior	5	Téc. 3	4,730E+09	1,024E+09	3,390E+07	4,509E+10	54,63	7,453	7,146	7,238
VALOR PADRÃO			<0,2E+09	<1E+09	<6,5E+08	≥5,5E+10	45-60 ml	6,4-7,4	6,4-7,4	6,4-7,4

(1)Tempo = 1,2,3,4 e 5 correspondem aos intervalos definidos; (2) pH1 = determinação por aparelho pHmetro, pH METER modelo HM-6A®; (3) pH2 = determinação do pHpor fita de pHmar Merck® referência 9557, destinada a medir pH variável de 6,4-8,0;(4) pH3 = determinação do pH por aparelho de gasometria venosa NOVA Star Profile Plus5® do Laboratório de Análises Clínic do Hospital Universitário/FMB.

**Tabela 3 - Avaliação da interferência das centrífugas nos resultados hematimétricos obtidos por um
um mesmo observador**

Limite de Confiança	Centrífuga⁽¹⁾	Glob. brancos	Glob. Vermelhos	Linfócitos	Plaquetas	pH1⁽²⁾	pH2⁽³⁾	pH3⁽⁴⁾
Inferior	C1	1,920E+06	2,310E+08	1,130E+07	1,660E+10	7,359	7,078	7,25
Superior	C1	3,800E+06	5,810E+08	2,320E+07	2,600E+10	7,575	7,17	7,288
Inferior	C2	3,430E+06	1,000E+09	2,460E+07	4,680E+10	7,218	7,016	7,052
Superior	C2	5,080E+06	2,010E+09	3,640E+07	6,060E+10	7,344	7,096	7,147
VALOR PADRÃO		<0.2E+09	<1E+09	<6,5E+10	≥5,5E+10	6,4-7,4	6,4-7,4	6,4-7,4

(1) C1 = centrífuga FANEN F22®, C2 = centrífuga MLW Eletronic K 80®; (2) pH1 = determinação do pH por aparelho pH METER modelo HM-6A®, (3) pH2 = determinação do pH por fita, marca Merck® referência 9557, destinada a medir pH variável de 6,4-8,0; (4) pH3 = determinação do pH por aparelho de gasometria venosa NOVA Star Profile Plus5®do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário/FMB.

AUSÊNCIA DO HBV-DNA POR PCR EM SOROS DE DOADORES DE SANGUE COM HBsAg NEGATIVO E ANTI-HBc POSITIVO EM REGIÃO DE ALTA PREVALÊNCIA DE HEPATITE B

LARGURA, MA; PACHECO, M; LARGURA, A.
Laboratório ALVARO – Cascavel Pr.

SUMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	III
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	IV
RESUMO.....	V
SUMMARY.....	VI
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAIS.....	6
2.1 AMOSTRAS.....	6
2.2 MÉTODOS.....	8
3 RESULTADOS.....	13
4 DISCUSSÃO.....	19
5 CONCLUSÃO.....	22
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

ALT	Alanina aminotransferase (alanine transaminase)
HAV	Vírus da Hepatite A (Hepatitis A virus)
HBV	Vírus da Hepatite B (Hepatitis B virus)
HCV	Vírus da Hepatite C (Hepatitis C virus)
HDV	Vírus da Hepatite D (Hepatitis D virus)
HEV	Vírus da Hepatite E (Hepatitis E virus)
HGV	Vírus da Hepatite G (Hepatitis G virus)
Anti-HBc	Anticorpo do antígeno core da hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo do antígeno de superfície da hepatite B
Anti-HBe	Anticorpo do antígeno “e” da hepatite B
HBcAg	Antígeno core da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície da Hepatite B (Hepatitis B “s” antigen)
HBeAg	Antígeno “e” da Hepatite B (Hepatitis B “e” antigen)
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
ELISA	Enzimaimunoensaio (Enzyme- linked immunoassay)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
MEIA	Enzimaimunoensaio de micropartículas (Microparticle Enzyme Immunoassay)

III

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELAS

01	PREPARADO (MIX) PARA 1º PCR.....	10
02	PREPARADO (MIX) PARA 2º PCR.....	11
03	CORANTES UTILIZADOS.....	11
04	VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E PREVALÊNCIA DE ANTI-HBc POSITIVO EM DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE.....	13
05	VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E PREVALÊNCIA DE HBsAg POSITIVO EM DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE.....	13

QUADROS

01	LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DO HBV-DNA PELA TÉCNICA DE NESTED-PCR.....	15
02	RESULTADOS SOROLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E NESTED-PCR OBTIDOS DE 50 AMOSTRAS DE DOADORES DE SANGUE HBsAg NEGATIVO E ANTI-HBc POSITIVO.....	17

FIGURA

01	LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DO HBV-DNA PELA TÉCNICA DE NESTED - PCR.....	16
----	--	----

Foram estudados soros de 50 doadores voluntários de sangue, com antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) negativo, anticorpo do antígeno core da hepatite B (anti-HBc) positivo e níveis normais de alanina aminotransferase (ALT), provenientes de uma população de alta prevalência de hepatite B. As estatísticas do HEMEPAR (Instituto de Saúde do Paraná - Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná), regional de Cascavel mostram uma prevalência de anti-HBc positivo em 1995 e 1996 de 33,8% e 31,1% na região Oeste do Paraná. Um método sensível, nested-PCR foi usado para pesquisar o DNA viral da hepatite B (HBV-DNA). O limite mínimo de detecção foi de 300 genomas por mL. Em todos os 50 soros anti-HBc positivo e HBsAg negativo analisados pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase não foi encontrado DNA viral da hepatite B (HBV-DNA). Estes achados indicam que o descarte de todas as unidades de sangue ou hemoderivados com os marcadores, anti-HBc positivo e HBsAg negativo, pode ser melhor avaliado quando se realiza a pesquisa do HBV-DNA pela técnica de PCR.

SUMMARY

Serum from 50 voluntary blood donors with hepatitis B surface antigen (HBsAg) negative, antibody against hepatitis B core antigen (anti-HBc) positive and normal serum alanine aminotransferase levels from a population with high prevalence of hepatitis B, were studied. The high prevalence of antibody to hepatitis B core antigen (anti-HBc) positive (33,8% and 31,1% in 1995 and 1996) in the west region of Parana were determined by the Hemepar (Instituto de Saúde do Paraná - Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná) regional de Cascavel. A sensitive, nested-PCR assay was used to detect HBV-DNA. The lower limit for detection by the PCR assay was 30 genomes per mL of HBV-DNA. HBV-DNA was not detected by PCR in 50 blood donors with HBsAg negative and anti-HBc positive.

These findings suggest that exclusion of all blood units from blood donors with hepatitis B surface antigen (HBsAg) negative and antibody against hepatitis B core antigen (anti-HBc) positive, needs reevaluation when HBV-DNA is detected by PCR assay.

Key words - HBV-DNA, DNA virus, HBV, PCR

1 INTRODUÇÃO

Hepatites virais constituem grave problema de saúde pública no mundo todo. Dentre os agentes causadores de hepatites virais destaca-se o vírus da hepatite B (HBV). Clinicamente a

doença por HBV pode se manifestar de várias formas, que vão desde a forma assintomática autolimitada até a forma fulminante, passando pela condição de portador crônico-assintomático, estando associado ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e cirrose hepática por evolução de hepatite viral crônica. (TORRES JR, *et al.*, 1994).

Estima-se que atualmente mais de 300 milhões de pessoas sejam portadoras do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em todo o mundo. Só na Ásia, 220 milhões de pessoas tem HBsAg positivos enquanto que na América do Norte e países da Europa, 2 milhões são portadores de HBsAg. O número de mortes por formas agudas ou crônicas da infecção por HBV é estimado em aproximadamente 1 milhão de pessoas por ano. (Organização Mundial da Saúde, 1994)

O HBV pertence ao grupo *hepadnaviridae* (virus DNA hepatotrópico) e consiste de uma partícula esférica com dupla camada, externa e interna, com 42 nm de diâmetro, descrito originalmente como partícula de DANE. (DANE *et al.*, 1970) A camada interna é composta de núcleo icosaédrico, *core*, de 27 nm de diâmetro, contém genoma viral (DNA de forma circular, parcialmente de dupla hélice e parcialmente de simples fita), DNA polimerase com atividade de transcriptase reversa, proteína kinase e uma proteína antigênica principal, antígeno core da hepatite B (HBcAg), expresso na superfície do core, e um antígeno “e” (HBeAg). O HBeAg é um antígeno solúvel, não particulado, presente na mesma proteína do HBcAg e derivado da

2

clivagem proteolítica do HBcAg (MILLER *et al.*, 1987), ambas indicativas de infectividade (ROBINSON e LUTWICK, 1976). A camada externa ou envelope de 7 nm, contém a proteína Maior do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), codificado pelo S do DNA viral. Além desta proteína, são expressas duas outras proteínas no envelope da partícula do HBV : a proteína

Média (M) codificada pela região pré-S2 e gen S, e a proteína Grande (L) codificada pela região pré-S1, pré-S2, e S. O antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) é encontrado nas três proteínas (TIOLLAIS *et al.*, 1985).

Após a década de 60, quando foi identificado o “ Antígeno Austrália, o diagnóstico da infecção pelo HBV começou a ser objeto de intenso estudo, (BLUMBERG *et al.*, 1965). Desde então, diversas abordagens diagnósticas tem sido estudadas, sendo que a imunológica é a mais usada na clínica e em estudos epidemiológicos. Com a introdução dos “marcadores virais de hepatite B”, métodos de detecção de antígenos e anticorpos específicos, os quais, quando interpretados em conjunto podem fornecer dados importantes para o estabelecimento do *status* dos pacientes em relação à hepatite B.

Diversos marcadores virais são utilizados para fins de triagem, dentre eles, destacam-se o HBsAg , anti-HBs, anti-HBc, HBeAg e anti-HBe. (MARTELLI *et al.*,1991). Os principais métodos de triagem utilizados para sua determinação são; Hemaglutinação, Radioimunensaio, Enzimaimunoensaio, Quimioluminescencia e mais recentemente as técnicas de Biologia Molecular que têm contribuído para o conhecimento e a epidemiologia de doenças infecciosas, dentre elas, a hepatite pelo HBV. Apresentando-se mais refinadas e acessíveis, elas estão sendo

cada vez mais introduzidas na prática médica para fins de diagnóstico, controle terapêutico e epidemiológico (HOFNAGLE *et al.*, 1996). Em condições precisamente controladas, as técnicas

moleculares aumentaram a sensibilidade e a especificidade de detecção do HBV em amostras clínicas, sendo que atualmente é possível a detecção de menos de 10 genomas por mililitro de soro analisado. (KANEKO *et al.*, 1989; DOUGLAS *et al.*, 1993).

A reação em cadeia pela polimerase permite a amplificação do DNA “in vitro”, utilizando-se basicamente de uma reação enzimática catalizada pela polimerase, cuja atividade depende de ions Mg^{++} , e ocorre em 3 etapas: desnaturação, que consiste na separação da dupla fita de DNA a ser amplificado; anelamento ou hibridização, ligação do iniciador ou “primer” ao DNA a ser amplificado e extensão, polimerização propriamente dita. Metodologicamente a técnica de PCR requer três passos. (SAIKI, *et al.*, 1989)

A presença do vírus da hepatite B (HBV-DNA) é um marcador viral de replicação e infectividade. (MALTER *et al.*, 1991). A detecção direta do DNA do vírus da hepatite B (HBV-DNA) no soro é atualmente usado na clínica para avaliar a viremia da pessoa infectada, portadores crônicos e para monitorar a eficácia da terapia antiviral. (HESS *et al.*, 1993)

A maioria dos estudos de rastreamento e detecção populacional de prevalência da presença do vírus B habitualmente são realizados em populações selecionadas como doadores de sangue, gestantes, grupos considerados “de risco”, presidiários, profissionais da saúde e militares. Em muitas regiões, principalmente na América Latina, os dados epidemiológicos disponíveis provêm de doadores de sangue, principalmente porque esta é uma população de acesso para estudo relativamente fácil de que se dispõe para exames laboratoriais e

acompanhamento clínico de controle. Contudo, os dados epidemiológicos destas regiões devem ser considerados com cautela, uma vez que não existem estudos longitudinais sobre o assunto e

os dados atuais se baseiam nestas populações de doadores de sangue, os quais, por definição, são indivíduos clinicamente normais (MARTELLI *et al.*, 1991).

O diagnóstico da hepatite por HBV é realizado pela demonstração de níveis detectáveis de HBsAg. Adicionalmente utiliza-se outro marcador, o anti-HBc com a função de proporcionar uma cobertura sorológica no período da “janela imunológica”, onde o indivíduo ainda está contaminado pelo HBV, e não possui níveis de HBsAg, problema relativamente contornado pela determinação do Anti-HBc (DOUGLAS *et al.*, 1993).

Até 1993, os bancos de sangue no Brasil utilizavam somente HBsAg como marcador de infectividade pelo vírus B. Contudo, ainda restava um risco de desenvolvimento de hepatites pós-transfusionais, por conta da janela imunológica. Neste ano, o Ministério da Saúde tornou, através da portaria 1376, obrigatória a realização da determinação do anti-HBc como teste auxiliar.

Com a determinação do anti-HBc houve uma relativa diminuição de hepatites pós-transfusionais por HBV (MARTELLI *et al.*, 1991).

Considerando-se que, a partícula *core* do HBV incita uma resposta imune bastante pronunciada e a crescente observação da ocorrência de resultados falso-positivos para anti-HBc em pacientes com história clínica e laboratorial incompatível com contatos prévios com o vírus, especialmente em populações de baixa prevalência da doença, nota-se cada vez mais a

necessidade de se produzir dados de maior valor preditivo para o uso clínico e a melhora dos critérios de seleção de doadores de sangue (ROBERTSON *et al.*, 1991).

Os dados da literatura são discordantes em relação à presença ou não de HBV-DNA em quantidades detectáveis em pacientes HBsAg negativos e anti-HBc positivos. Nota-se que os trabalhos que demonstram a presença de HBV-DNA foram detectados em populações de altas taxas de prevalência, enquanto que os trabalhos que não demonstram a presença de HBV-DNA provém de populações de baixa prevalência (DOUGLAS *et al.*, 1993).

O objetivo do presente trabalho é a detecção do HBV-DNA através da técnica de nested-PCR, em soros de doadores voluntários de sangue positivos para anti-HBc e negativos para HBsAg em uma região de alta prevalência de hepatite B.

2 MATERIAIS

2.1 AMOSTRAS

Foram analisadas pelo HEMEPAR (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná), 77.045 amostras de soros obtidas de doadores voluntários de sangue das quatro regiões do Estado do Paraná; Curitiba, Londrina, Maringá e Cascavel. Na região de Cascavel, os doadores eram provenientes dos municípios: Cascavel, Foz do Iguaçu, Toledo, Medianeira, Guaraniaçu, Roncador, Cafelândia, Vera Cruz do Oeste, Terra Roxa, Tupãnsi e Capitão Leonidas Marques, que fazem parte do Oeste do Paraná. Todas as informações foram fornecidas pelo Hemocentro (Regional de Cascavel) cujo Laboratório realiza os testes da região Oeste. Este estudo retrospectivo foi realizado com dados de 1995 e 1996 (1º semestre). Com os resultados determinou-se a prevalência regional de portadores assintomáticos do vírus da hepatite B e portadores de anticorpo HBc provenientes de infecção pregressa do vírus da hepatite B.

Para a detecção do HBV-DNA por PCR foram selecionados 50 soros de doadores voluntários de sangue coletados entre os dias 10 e 22 de outubro de 1996 obedecendo os seguintes critérios: ausência de HBsAg, presença de anti-HBc e ALT normais. Estas 3 análises foram realizadas pelo Hemocentro de Cascavel. A segunda análise de anti-HBc com outra metodologia com o objetivo de comparar resultados por dois kits de procedências diferentes e os demais testes foram efetuados nas dependências do serviço de Imunologia e de Biologia Molecular do Laboratório Alvaro (Cascavel). Adicionalmente foram realizadas a pesquisa quantitativa de anti-HBs das 50 amostras e a pesquisa de anti-HBe das amostras que evidenciaram ausência de anti-HBs. Para estabelecer limites de detecção mínima de HBV-DNA,

7

determinando a sensibilidade da técnica nested - PCR, foi diluída uma amostra de soro positivo para antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e antígeno “e” (HBeAg) previamente analisado quantitativamente.

2.2 MÉTODOS

ALT - As determinações de ALT foram realizadas utilizando-se o *kit* comercial *Genetic Systems - Sanofi Pasteur*, método enzimático cinético, com ponto de corte normal/anormal de 34 UI/L.

HBsAg - A determinação do antígeno HBsAg foi realizada com o *kit* comercial *Monolisa HBsAg* da *Sanofi Pasteur*; enzimaímunoensaio tipo sanduíche. Os testes foram realizados conforme as recomendações do fabricante.

HBeAg - Os testes foram realizados com o Kit comercial, Abbott AXSYM, enzimaímunoensaio de micropartículas (MEIA). Os testes foram realizados conforme as recomendações do fabricante.

Anti-HBs - Os testes foram realizados com o Kit comercial, Abbott AXSYM (Hepatitis B surface Antigen [Recombinant] [subtypes ad and ay]) AUSAB, enzimaímunoensaio de micropartículas (MEIA). Os testes foram realizados conforme as recomendações do fabricante.

Anti-HBc - Os anticorpos totais dirigidos contra o antígeno *core* do HBV foram determinados utilizando o *kit* comercial *Monolisa anti-HBc* da *Sanofi Pasteur*, enzimaímunoensaio de competição e o *kit* comercial, Abbott - AXSYM (CORE - Antibody to Hepatitis Virus Core Antigen), enzimaímunoensaio de micropartículas (MEIA).

Anti-HCV - A determinação dos anticorpos para Hepatite C, foi realizada com *kit* comercial, Abbott - AXSYM (Hepatitis C Virus Encoded Antigen, recombinant c200, c22-3, HC-34 e HC-31), enzimaímunoensaio de micropartículas (MEIA).

HBV-DNA - Foram testadas 50 amostras para determinar a presença de HBV-DNA por técnica nested-PCR, onde foram utilizados *primers* específicos para regiões conservadas da região *core* do genoma do HBV conforme a técnica descrita por KANEKO e colaboradores, utilizando a técnica de extração com NaOH/HCl (KANEKO *et al.*, 1989). Os *primers* foram utilizados conforme KANEKO e colaboradores. Na primeira amplificação (externa) foi utilizado o *primer* 1763 (5'-GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAA-3'), e o *primer* 2032 (5'-CTGACTACTAATTCCTGGATGCTGGGTCT-3'). Na segunda amplificação (interna) foi utilizado o *primer* 1778 (5'-GACGAATTCCATTGACCCGTATAAAGAATT-3') e 2017 (5'-ATGGGATCCCTGGATGCTGGGTCTTCCAAA-3') (KANEKO, *et al.*, 1989). Assim, em tubos cônicos de microcentrifugação de capacidade 0.6 mL (*Eppendorf*) adicionou-se 1 μ L de solução NaOH 1M a 10 μ L de soro centrifugado, para obter-se uma concentração final de 0.1 M de NaOH. A mistura foi incubada por 60 minutos a 37°C, posteriormente centrifugada por 15 segundos e neutralizada com 1 μ L de HCl 1M, com a obtenção de concentração final de 0.1 M de HCl. O resultado deste processo foi utilizado diretamente no processo de amplificação. Ao tubo de extração adiciona-se 50,73 μ L do “master mix” como descrito na tabela seguinte, para a primeira amplificação:

TABELA 01 - PREPARADO (MIX) PARA 1° PCR.

Componente	Quantidade	Comentários
dNTP's (bases nitrogenadas tri-fosfatadas)	2 <i>ul</i> de cada base	-dGTP - 2'Deoxyguanosine 5'- Triphosphate -dATP - 2'Deoxyadenosine 5'- Triphosphate -dCTP - 2'Deoxycytidine 5'- Triphosphate -dTTP - 2'Deoxythymidine 5'- Triphosphate Pharmacia Biotech
Água	35 <i>ul</i>	Água purificada tipo I, obtida com Milipore MiliQ
Tampão	5 <i>ul</i>	100 mM Tris-HCl (pH 8.0); 500 mM KCl; 15 mM MgCl CENBIOT/RS (UFRGS, Porto Alegre, RS)
Primer 2032	1.1 <i>ul</i>	0,25 <i>uM</i> ; NBI (National Biosciences, Incorporation) Minnesota, USA
Primer 1763	1.37 <i>ul</i>	0,25 <i>uM</i> ; NBI (National Biosciences, Incorporation) Minnesota, USA
Taq DNA polimerase	0.26 <i>ul</i>	5 U/ μ L - 500U CENBIOT/RS (UFRGS, Porto Alegre, RS)

Fonte: Elaborada por KANEKO, 1989 *et al.*, modificado pelo autor.

O primeiro *round* de PCR foi realizado em um termociclador (*Minicycler, MJ, research, inc.*) para 30 ciclos de amplificação na seguinte ordem: desnaturação a 94°C por 90 segundos; anelamento a 42°C por 4,5 minutos; e extensão a 72°C por 2,5 minutos. Após estes ciclos as amostras passaram por um período de extensão final a 72°C por 10 minutos.

O resultado deste primeiro passo de amplificação foi submetido a mais um *round* de amplificação utilizando a solução com os *primers* internos, conforme segue: a 10uL do produto

final da primeira amplificação foram adicionados 45,98 μ L do preparado de amplificação descrito abaixo. Este segundo *round* de amplificação foi realizado no mesmo termociclador do primeiro *round* com a mesma programação dos ciclos.

TABELA 02 - PREPARADO (MIX) PARA 2° PCR.

Componente	Quantidade	Comentários
dNTP's (bases nitrogenadas tri-fosfatadas)	2 μ l de cada base	-dGTP - 2'Deoxyguanosine 5'- Triphosphate -dATP - 2'Deoxyadenosine 5'- Triphosphate -dCTP - 2'Deoxyctidine 5'- Triphosphate -dTTP - 2'Deoxythymidine 5'- Triphosphate Pharmacia Biotech
Água	30 μ l	Água purificada tipo I, obtida com Milipore MiliQ
Tampão	5 μ l	100 mM Tris-HCl (pH 8.0); 500 mM KCl; 15 mM MgCl CENBIOT/RS (UFRGS, Porto Alegre, RS)
Primer 1778	1.46 μ l	0,25 μ M; NBI (National Biosciences, Incorporation) Minnesota, USA
Primer 2017	1.20 μ l	0,25 μ M; NBI (National Biosciences, Incorporation) Minnesota, USA
Taq DNA polimerase	0.26 μ l	5 U/ μ L - 500U CENBIOT/RS (UFRGS, Porto Alegre, RS)

Fonte: Elaborada por KANEKO, 1989 *et al.*, modificado pelo autor

Do material resultante desta segunda amplificação foram retirados 15 μ L e adicionados 5 μ L de uma solução corante preparada conforme segue:

TABELA 03 - CORANTES UTILIZADOS

Componente	Quantidade	Comentários
Azul de bromofenol	0.100 g	Fisher Biotech
Xileno Cianol	0.100 g	Sigma
Sucrose	16.0 g	Sigma
Água tipo I	40 ml	

Fonte: Elaborada pelo autor

Na sequência, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, com visualização sob luz ultravioleta após o tratamento do gel eletroforetizado com brometo de etídio. A cada bateria de testes foram incluídos controles positivos, controles dos reagentes e controles negativos, para garantia do teste. Todas as amostras foram testadas em duplicata. O soro controle fortemente positivo (+++) e fracamente positivo (+) foi testado e quantificado previamente segundo a técnica de (KANEKO *et al.*, 1989), com 3×10^{-7} genomas por mL e 300 genomas por mL. Como controle negativo foi usado HBV-DNA negativo (Abbott Laboratories).

A sensibilidade do teste foi determinada pela diluição serial com fator 10 de uma amostra positiva quantificada para HBV-DNA conforme KANEKO com resultado de 3×10^{-7} genomas por mL de soro. Estabelecendo o limite de detecção mínima para a técnica de nested-PCR.

3 RESULTADOS

TABELA 04 -VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E PREVALÊNCIA DE ANTI-HBc POSITIVO EM DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE.

	1995			1996		
Localidade	No de soros testados	No de soros positivos	Percentual %	No de soros testados	No de soros positivos	Percentual %
Curitiba	24451	2452	10,0	13335	1049	7,8
Londrina	10041	1271	12,6	5735	589	10,2
Maringá	8280	444	5,3	4045	156	3,8
Cascavel	5989	2027	33,8	2579	803	31,1

Fonte: Instituto de Saúde do Paraná - Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná - HEMEPAR

TABELA 05 - VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E PREVALÊNCIA DE HBsAg POSITIVO EM DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE.

	1995			1996		
Localidade	Nº de soros testados	Nº de soros positivos	Percentual %	Nº de soros testados	Nº de soros positivos	Percentual %
Curitiba	26775	161	0,60	13335	65	0,48
Londrina	10943	60	0,54	5735	50	0,87
Maringá	8280	33	0,39	3409	19	0,55
Cascavel	5989	154	2,57	2579	65	2,52

Fonte: Instituto de Saúde do Paraná - Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná - HEMEPAR

A TABELA 04 mostra as quatro regiões do estado do Paraná , Curitiba, Londrina, Maringá e Cascavel em que foram analisadas 74.455 amostras de soros. Destas, 8.791 (11,8%) apresentaram o marcador de hepatite B, anti-HBc positivo. A região de Cascavel mostra uma

prevalência de anti-HBc positivo nitidamente elevada (33,8 % e 31,1% em 1995 e 1996) comparando-a com Londrina (12,6% e 10,2% em 1995 e 1996), Curitiba (10,0% e 7,8% em 1995 e 1996) e Maringá (5,3% e 3,8 % em 1995 e 1996). A inexistência de sintomas clínicos anteriores de hepatite B foi descartada pela entrevista pré coleta de sangue de todos os doadores. Este fato demonstra que se os resultados de anti-HBc positivo são indicativos de infecção prévia pelo vírus da hepatite B, os índices de prevalência de hepatite B na região de Cascavel são bem maiores do que 33,8% e 31,1% (1995 e 1996). Mesmo assim, estimativas de prevalência pelo vírus da hepatite B obtidas em bancos de sangue tem se constituído em referência para estabelecer o nível endêmico em diferentes regiões.

A TABELA 05 mostra a prevalência de HBsAg positivo nas quatro regiões do estado do Paraná. Foram analisadas 77.045 amostras de soros e 607 (0,78%) evidenciaram a presença do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). A região de Cascavel mostra uma prevalência de HBsAg positivo elevada (2,5 % em 1995 e 1996), comparando-a com Curitiba (0,6 % e 0,4% em 1995 e 1996), Londrina (0,5 % e 0,8 % em 1995 e 1996) e Maringá (0,3% e 0,5% em 1995 e 1996).

Estes dois fatos: alta prevalência de soros anti-HBc positivos (TABELA 05) e HBsAg positivos (TABELA 05) demonstram o nível endêmico da Hepatite B na região Oeste do Paraná.

QUADRO 01 - LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DO HBV-DNA PELA TÉCNICA DE NESTED - PCR.

Controle positivo diluição serial	HBV-DNA (genomas/mL)	PCR (Resultados)
Não diluído	30.000.000.000	+++
1:10	3.000.000.000	+++
1:100	300.000.000	+++
1:1.000	30.000.000	++
1:10.000	3.000.000	++
1:100.000	300.000	++
1:1.000.000	30.000	+
1:10.000.000	3.000	+
1:100.000.000	300	+
1:1.000.000.000	30	-
1:10.000.000.000	3	-
Negativo		-
Positivo		+
Reagente		-

Fonte: Elaborada por DOUGLAS, 1993 *et al.*, modificado pelo autor

Para determinar a sensibilidade da técnica nested-PCR foi realizado uma diluição serial em água (tipo I - Milipore MilQ-S) de um soro positivo (HBsAg positivo e HBeAg positivo) com 3×10^{10} (QUADRO 01) genomas por mL determinado segundo KANEKO *et. al*, 1989. A positividade (sinal) em agarose corado por brometo de etídio, é visível até 300 genomas por mL (diluição de 3×10^{-7}). Esta sensibilidade é similar a descrita previamente por DOUGLAS, *et al* 1993.

FIGURA 01 - LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DO HBV-DNA PELA TÉCNICA DE NESTED - PCR.

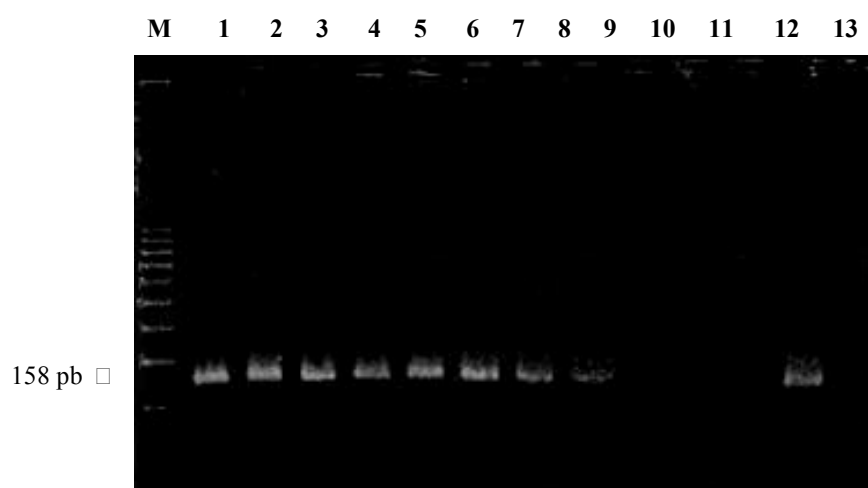


FIG. 1. Eletroforese em gel de agarose 2% com produto de DNA amplificado por PCR. Diluição serial com fator 10 de uma amostra positiva quantificada para HBV-DNA com 3×10^{10} /mL de soro, foram amplificados com primers 1778 e 2017 (vide materiais e métodos). 1, marcador DNA (GenSura); 2, 10^{-1} pg; 3, 10^{-2} pg; 4, 10^{-3} pg; 5, 10^{-4} pg; 6, 10^{-5} pg; 7, 10^{-6} pg; 8, 10^{-7} pg; 9, 10^{-8} pg; 10, 10^{-9} pg; 11, Controle negativo(-); 12, Controle positivo(+); 13, Controle Reagente.

QUADRO 02 - RESULTADOS SOROLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E NESTED-PCR OBTIDOS DE 50 AMOSTRAS DE DOADORES DE SANGUE HBsAg NEGATIVO E ANTI-HBc POSITIVO.

Nº	Data	Idade	Cidade	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs	ALT	HCV	PCR
1	10/10	26	CVEL	-	+	0,0	N	-	-
2	10/10	25	FIGÇU	-	+	0,0	N	-	-
3	10/10	32	CVEL	-	+	> 1000,0	N	-	-
4	11/10	40	TOL	-	+	> 1000,0	N	-	-
5	11/10	21	PROL	-	+	47,0	N	-	-
6	11/10	31	TOL	-	+	27,8	N	-	-
7	11/10	46	TOL	-	+	15,1	N	-	-
8	14/10	44	TOL	-	+	870,0	N	-	-
9	15/10	32	CVEL	-	+	> 1000,0	N	-	-
10	15/10	48	MED	-	+	73,4	N	-	-
11	15/10	35	TOL	-	+	0,0	N	-	-
12	15/10	47	TOL	-	+	46,9	N	-	-
13	15/10	33	TOL	-	+	895,0	N	-	-
14	15/10	24	TOL	-	+	> 1000,0	N	-	-
15	15/10	41	TOL	-	+	930,0	N	-	-
16	11/10	18	TOL	-	+	> 1000,0	N	-	-
17	11/10	25	GUAR	-	+	0,0	N	-	-
18	11/10	30	GUAR	-	+	205,0	N	-	-
19	11/10	30	GUAR	-	+	53,4	N	-	-
20	11/10	39	GUAR	-	+	840,0	N	-	-
21	16/10	57	CVEL	-	+	1,2	N	-	-
22	16/10	29	CVEL	-	+	72,5	N	-	-
23	16/10	22	CVEL	-	+	168,7	N	-	-
24	16/10	32	CVEL	-	+	> 1000,0	N	-	-
25	16/10	37	CVEL	-	+	36,0	N	-	-
26	16/10	30	ALTO	-	+	6,0	N	-	-
27	16/10	25	ALTO	-	+	> 1000,0	N	-	-
28	16/10	35	TOL	-	+	> 1000,0	N	-	-
29	16/10	31	CVEL	-	+	77,2	N	-	-
30	17/10	29	CVEL	-	+	98,2	N	-	-
31	17/10	23	GUAR	-	+	> 1000,0	N	-	-
32	17/10	26	CVEL	-	+	101,3	N	-	-
33	17/10	22	MED	-	+	> 1000,0	N	-	-
34	17/10	25	CVEL	-	+	> 1000,0	N	-	-
35	17/10	24	CVEL	-	+	0,0 (*)	N	-	-
36	17/10	29	VERA	-	+	909,0	N	-	-
37	17/10	41	CVEL	-	+	950,0	N	-	-
38	18/10	35	TOL	-	+	48,0	N	-	-
39	19/10	30	TUP	-	+	12,1	N	-	-
40	21/10	28	RONC	-	+	97,0	N	-	-
41	21/10	24	RONC	-	+	10,0	N	-	-
42	21/10	26	RONC	-	+	> 1000,0	N	-	-
43	21/10	42	CAP	-	+	655,0	N	-	-
44	21/10	36	TERR	-	+	533,2	N	-	-
45	21/10	33	GUAI	-	+	2,2	N	-	-
46	21/10	43	GUAI	-	+	81,9	N	-	-
47	21/10	45	CVEL	-	+	> 1000,0	N	-	-
48	21/10	49	CAF	-	+	> 1000,0	N	-	-
49	22/10	41	GUAR	-	+	103,5	N	-	-
50	22/10	59	CVEL	-	+	20,2	N	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor, com dados fornecidos pela HEMEPAR - Cascavel.

(*) anti-HBe negativo

O QUADRO 02 sumariza os resultados do estudo sorológico, bioquímico e nested-PCR para pesquisa de HBV-DNA de 50 amostras de soros obtidas de doadores de sangue da região Oeste do Paraná. Das 50 amostras analisadas, HBsAg negativo, anti-HBc positivo e alanina aminotransferase normais, nenhuma demonstrou a presença do anticorpo da hepatite C (HVC). Adicionalmente foi realizado a pesquisa do anticorpo de superfície da hepatite B (anti-HBs), que das 50 amostras, 42 (84%) demonstraram a presença de anti-HBs e 5 (10%) foram negativas (amostras de números: 1,2,11,17 e 35) e 3 (6%) amostras apresentaram níveis de anticorpos abaixo do ponto de corte (amostras de número : 21,26 e 45) . O ponto de corte para o anti-HBs pela técnica Imunoenzimática (MEIA - Abbott - sistema AxSYM) considera reativo valores iguais ou superiores à 10.0 mUI/mL. Das 8 amostras anti-HBs negativas (amostras de números 1,2,11,17,21,26,35 e 45) realizou-se a pesquisa do anti-HBe, sendo que 7 apresentaram resultado positivo; somente 1 (amostra de número 35) negativo, mostrando que somente 1(2%) das 50 amostras de soros continha somente o marcador anti-HBc positivo isoladamente. Não foi detectado a presença de HBV-DNA pela técnica nested-PCR em nenhuma das 50 amostras de soros provenientes de doadores de sangue HBsAg negativo e anti-HBc positivo. Todas as amostras foram testadas em duplicata. O soro controle fortemente positivo (+++) e fracamente positivo (+) foi testado e quantificado previamente segundo a técnica de KANEKO, 1991, com 3×10^7 genomas por mL. Como controle negativo foi usado HBV-DNA negativo (Abbott Laboratories).

4 DISCUSSÃO

Em diferentes regiões dos Estados Unidos da América do Norte (AUBUCHON, JP; *et al.* 1989), num estudo de 2,3 milhões de amostras de soros obtidas de doadores de sangue detectaram uma prevalência de 1,3% a 4,6% anti-HBc positivo. A Cruz Vermelha Americana (KLINE, WE; *et al.* 1990) testaram 107.473 soros de doadores voluntários de sangue de diversas regiões do Estados Unidos da América do Norte, a prevalência de anti-HBc positivo foi de 2,6% com uma variação de 0,55 a 6,3%. No Brasil a prevalência de doadores de sangue com HBsAg positivo está assim distribuída: Região Sul 0,3 a 2 %, Norte 2 a 8% e especificamente no Estado do Amazonas > 10% (HADLER *et al.*, 1987). Em um outro estudo no Brasil, (VIP, ED; AMATO, V; *et al.*, 1992), determinaram a prevalência de anti-HBc em dois grupos, 2521 doadores de sangue e 345 profissionais admitidos no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP). As percentagens de positividade para o anti-HBc foram 9,89% e 6,19%. Nossos resultados evidenciam uma diferença significativa entre os resultados positivos de HBsAg nas quatro regiões estudadas no Paraná. A região de Curitiba apresentou uma variação de 0,6 a 0,48% de um ano para outro (1995 - 1996); A região de Londrina com 0,54 a 0,87 %; A região de Maringá com 0,39 a 0,55 % e a região de Cascavel com percentuais de 2,57 a 2,5 %. Da mesma forma é significativa a prevalência de soros de doadores de sangue com anti-HBc positivo na Região de Cascavel (33,8 a 33,1 % em 1995 e 1996). Enquanto que na região de Curitiba, 10% e 7,8%, Londrina 12,6% e 10,2%, e Maringá 5,3 e 3,8%, a prevalência é menor.

Diversos estudos retrospectivos (KAZIOL *et al.*, 1986; KATCHAKI, *et al.*, 1980; RAKELA, *et al.*, 1980) realizados antes da rotina de anti-HBc em bancos de sangue, mostraram que a incidência de hepatite B pós transfusão de sangue HBsAg negativo e anti-HBc positivo eram de 2 a 9%. Em um estudo realizado em amostras de banco de sangue americano (SCHIFMAN, *et al.*, 1993) concluem que 25% dos doadores de sangue com o anti-HBc positivo tinham o anti-HBe como único marcador de hepatite B positivo e que normalmente estes resultados são falsos positivos independente dos níveis encontrados. LIZUKA, *et al.* 1992, estudaram 294 soros de doadores de sangue que tinham como único marcador de hepatite B positivo o anti-HBc. Detectaram HBV- DNA por PCR em 12 (6.9%) dos 175 que tinham níveis altos de anti-HBc, sendo que nas 119 amostras com baixos níveis de anti-HBc os resultados de HBV DNA por PCR foram negativos. Os resultados da região Oeste do Paraná mostraram, das 50 amostras obtidas de doadores de sangue HBsAg negativo e anti-HBc positivo, a detecção de somente um caso (2%) que tinha como único marcador positivo o anti-HBc. A maioria dos soros (98%) tinham um segundo marcador positivo, 42(84%) o anti-HBs positivo e 7 (14%) anti-HBe positivo .

Amostras de 1828 doadores de sangue foram examinados (HUGHES, W; *et al.* ,1995) pesquisando-se anti-HBc em sete lugares do Reino Unido (UK) usando 10 tipos de kits de diferentes procedências. Somente 10 (0,55%) casos foram considerados positivos verdadeiros. Em todos os kits foram encontrados anti-HBc positivo de 1 a 43 amostras. Concluindo que a dependência de um único teste de ELISA é imprudente, recomenda um segundo teste como screening. Assim como HUGHES, *et al.* . 1995, outros autores citam diferenças significativas entre os diversos fabricantes de kits para anti-HBc. No trabalho aqui

apresentado optou-se por fazer os testes de anti-HBc por dois kits (Sanofi Pasteur e Abbott - sistema AxSYM) e não foi encontrada diferença entre os resultados.

WANG *et al.*, 1991 estudaram 206 soros de doadores de sangue (Taiwan) HBsAg negativo e anti-HBc positivo e detectaram HBV-DNA por PCR em 9(4%). O limite de detecção mínima do ensaio descrito foi de 150 genomas de HBV por mL. A população estudada era de alta prevalência de hepatite B. Já num estudo subsequente (DOUGLAS, *et al.* 1991) usando a técnica nested - PCR para HBV-DNA em um grupo de doadores (158) de sangue HBsAg negativo e anti-HBc positivo de uma população de baixa prevalência de hepatite B(0.6%), todos os resultados foram negativos para HBV-DNA. O limite mínimo de detecção determinado por DOUGLAS foi de 3 genomas de HBV- DNA por mL.

Nossos resultados mostraram a inexistência de HBV-DNA por PCR em 50 amostras de soros provenientes de doadores de sangue HBsAg negativo e anti-HBc positivo, de uma região de alta prevalência de hepatite B. O limite de detecção determinado foi de 300 genomas de HBV-DNA por mL.

A detecção de HBV por nested PCR é o teste mais sensível e específico para determinar o potencial de infectividade da hepatite B, enquanto que a pesquisa de anti-HBc é um ineficiente e inespecífico meio de testar o potencial de infectividade da hepatite B. (DOUGLAS *et al.*, 1992).

5 CONCLUSÃO

A grande quantidade de bolsas de sangue descartadas pelos bancos de sangue da região de Cascavel (Oeste do Paraná), pela alta prevalência de doadores com anti-HBc positivo, em alguns momentos inviabiliza a reposição dos estoques de sangue, além de se tornar oneroso financeiramente para as entidades. Os resultados aqui apresentados e os dados da literatura sugerem uma reavaliação nos critérios de descarte de todas estas unidades de sangue e hemoderivados, nas regiões de alta prevalência de hepatite B, principalmente associando aos testes já existentes, a pesquisa do HBV-DNA por nested-PCR.

- AUBUCHON, JP; SANDLER, SG; FANG, CT; DODD, RY. American Red Cross experience with routine testing for hepatitis B core antibody. **Transfusion**, v. 29, p.230-232, 1989.
- BLUMBERG, RS; ALTER, HJ; VISNICH, S. A “new” antigen in leukemia sera. **JAMA**, v.191, p.541, 1965.
- DOUGLAS, DD; TASWELL, HF; RAKELA, J; RABE, D. Absence of Hepatitis B Virus DNA detected by PCR in blood donors who are hepatitis B surface antigen negative and antibody to hepatitis B core antigen positive from a United States population with a low prevalence of Hepatitis B serologic markers. **Transfusion**, v.33, p.212-216, 1993.
- DANE, D.S.; CAMERON, H.C.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. **Lancet**, v.2, p626-628, 1968.
- HADLER, S; MURPHY, B; SCHABLE, C; HEYWARD, WL; FRANCIS, DP; KANE, M. Epidemiological Analysis of the Significance of Low-Positive Test results for Antibody to Hepatitis B Surface and Core Antigens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 20, p.521-525, 1984.
- HESS, G; REUSCHLING. Assessment of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid improves the diagnosis of hepatitis B virus infection. **Clin. Lab.**, v. 39, p. 389-394, 1993.
- HOOFNAGLE, JH; SCHAFER, DF. Serological markers of hepatitis B infection. **Diseases of the liver**, v.6, p.1-10, 1996.
- KANEKO, S; FEINSTONE, SM; MILLER, RH. Rapid and Sensitive Method for the Detection of Serum Hepatitis B Virus DNA Using the Polymerase Chain Reaction Technique. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p.1930-1933, 1989.
- KATCAKI, JN; STEM, TH; BROUWE, R; *et al.* Detection and significance of anti-HBc in the blood band: preliminary results of a controlled prospective study. **J. Virol. Methods**. v.2, p.119-125, 1980.

- KLINE, WE; BOWMAN, RJ; MCCURDY, KK; *et al.* Hepatitis B core antibody (anti-HBc) in blood donors in the United States; implications for surrogate testing programs. **Transfusion**, v.27(1), p.99-102, 1990.
- KOZIOL, DE; HOLLAND, PV; ALLING, DW, *et al.* Antibody to hepatitis B core antigen as a paradoxical marker for non-A, non-B hepatitis agents in donated blood. **Ann Intern. Med.**, v.104, p.488-495, 1986.
- LIZUKA, H; OHMURA, K; ISHIJIMA, A. Correalation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg. **Vox Sang**, v. 63, p.107-111, 1992.
- MALTER, JS; GERBER, MA. The polymerase chain reaction for hepatitis B virus DNA. **Hepatology**, v. 13, p. 188-190, 1991.
- MARTELLI, CMT; ANDRADE, ALSS; CARDOSO, DDP; *et al.* Considerações metodológicas na interpretação do rastreamento sorológico da hepatite B em doadores de sangue. **Revista de Saúde Pública São Paulo**, v. 25(1), p.11-16, 1991.
- MILLER, R.H. Proteolytic self-cleavage of hepatitis B virus core protein may generate serum *e* antigen. **Science**, v.236,p.722,1987.
- RAKELA, J; MOSLEY, JW. Viral hepatitis after transfusion with blood containing to hepatitis B core antigen. **Gastroenterology**, v.78, p.1318, 1980.
- ROBERTSON, EF; WEARE, JA; RANDELL, R; HOLLAND, PV; MADSEN, G; DECKER, R Characterization of a Reductio-Sensitive Factor from Human Plasma Responsible for Apparent False Activity in Competitive Assaus for Antibody to Hepatitis B Core Antigen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p.605-610, 1991.
- ROBINSON, WS; LUTWICK,L. The virus of hepatitis type B. **N. Engl. J. Med.**, v. 295, p. 1168, 1986.
- SAIKI, RK; GELFAND, DH. Introducing amplitaq DNA polymerase. **Amplifications.**, v.1 p.4-6, 1989.
- SCHIFMAN, RB; RIVERS, SL; SAMPLINER, RE; *et al.* Significance of isolated hepatitis B core antibody in blood donors. **Ann. Intern. Med.**, v.15(3), p.2261-2266, 1991.

- TIOLLAIS, P.; POURCEL, C.; DEJEAN, A. The hepatitis B virus. **Nature**, v. 317, p.489, 1985.
- TORRES, JR; MACHADO, V; Special aspects of hepatitis B virus and delta virus infection in latin america. **Infect. Dis. Clin.**, v.9, p. 13-27, 1994.
- VIP, DE; AMATO, VS; AMATO,V; SANTOS, TJL; MUSSI, NS; HAMERSCHLAK, N. Avaliação para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da hepatite B (HBV) nos candidatos aprovados em exame admissional de instituição hospitalar de São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 41, p. 141-143, 1992.
- WANG, JT; WANG, TH; SHEU, JC, et al. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. **J. Infect. Dis.**, v. 163(2), p.397-399, 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1994. Epidemiology of infection, p. 54-59, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, hepatitis viruses, vol. 59. World Health Organization Geneva.

Diagnóstico Molecular das Infecções do Sistema Nervoso Central pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

Molecular Diagnosis of Central Nervous System Infections by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Marisa Chesky¹, Rosana Scalco¹, Luciane Failace², Steven Read³ & Luiz Fernando Jobim⁴

Resumo

A identificação do agente etiológico é de fundamental importância no tratamento e prognóstico das infecções do Sistema Nervoso Central (SNC) porém, os métodos convencionais de diagnóstico tem limitado sucesso. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem possibilitado o diagnóstico de infecções virais, bacterianas e por protozoários de maneira mais rápida e precisa.

O objetivo deste estudo foi implantar, em nosso serviço, uma rotina ágil para o diagnóstico molecular dos microrganismos que mais frequentemente acometem o SNC.

As amostras de líquido (LCR) foram testadas para 20 agentes infecciosos: Herpes simplex, Herpes zoster, Enterovírus, vírus da Linfocoriomeningite, vírus Epstein-Barr, Adenovírus, Herpes hominis tipo 6, Sarampo, Caxumba, *Mycobacterium sp*, Citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, vírus JC, *Listeria monocytogenes*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Leptospira interrogans*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus sp*. A técnica usada foi o PCR “nested” com extração do RNA ou DNA das amostras pelo método de Boom modificado. Em algumas reações utilizou-se a combinação de “primers” de patógenos diferentes (“multiplex”), possibilitando a pesquisa de até três microrganismos na mesma reação, agilizando os resultados.

Foram testadas 281 amostras de LCR suspeitos de meningite ou meningoencefalite linfocitária ou asséptica. A PCR foi positiva em 18 amostras (6,4%). Os microrganismos detectados foram: *Mycobacterium sp* (7), Herpes simplex (5), Citomegalovírus (5), Herpes hominis tipo 6 (1) e *Toxoplasma gondii* (1).

*Trabalho realizado na Unidade de Imunologia - Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Apoio: FINEP e Conselho Britânico

¹ Farmacêuticas-Bioquímicas da Unidade de Imunologia do HCPA

² Médica Residente de Imunologia Clínica do HCPA

³ Microbiologista do Oxford Public Health Laboratory (UK)

⁴ Professor do Departamento de Medicina Interna da UFRGS, chefe da Unidade de Imunologia do HCPA

Em estudo paralelo com 22 amostras líquóricas de pacientes com meningite bacteriana, a PCR foi positiva em 21 casos (95,4%). Os microrganismos encontrados foram: *H. influenzae* (10), *Streptococcus sp* (6) e *N. meningitidis* (5). Em quatro pacientes com PCR positiva a cultura do LCR foi negativa.

A introdução da técnica de PCR em nosso laboratório otimizou o diagnóstico etiológico das infecções do SNC e tem se revelado de grande importância clínica.

PALAVRAS CHAVE - PCR, SNC, LCR, Meningite asséptica, Meningite bacteriana.

Summary

The identification of causative agents is very important in treatment and prognosis of the infections of Central Nervous System (CNS). The classical laboratory methods have not had enough success. The polymerase chain reaction (PCR) has been able of identifying a large range of viruses, bacteria and parasites that can infect the CNS. It has the advantage to be faster and to have more sensitivity and specificity than conventional techniques.

The aim of this study was to introduce a rapid and simple diagnostic routine by molecular method to detect the organisms that more frequently infect the CNS.

Cerebrospinal fluid (CSF) specimens were tested for a range of 20 agents: Herpes simplex virus, Varicella zoster virus, Enterovirus, Lymphocytic Choriomeningitis virus, Epstein-barr virus, Adenovirus, Human herpes type 6, Measles, Mumps, *Mycobacterium sp.*, Citomegalovirus, *Toxoplasma gondii*, JC virus, *Listeria monocytogenes*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira interrogans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus sp*. Nested PCR was performed with extraction of DNA and RNA by Boom method.

We tested 281 CSF specimens from patients with probable aseptic meningitis and encephalitis. PCR gave positive results in 18 samples (6,4% of all cases). The organisms detected were: *Mycobacterium sp.* (6), Herpes simplex (5), Citomegalovirus (5), Human herpes type 6 (1) and *Toxoplasma gondii* (1).

Other 22 CSF specimens from patients with bacterial meningitis were tested. PCR was positive in 21 cases (95,4%). The bacteria detected were: *H. influenzae* (10); *Streptococcus sp.* (6) and *N. meningitidis* (5). Four specimens with positive PCR did not grow in culture.

The development of methods for routine application of PCR improved the diagnosis of the CNS infections in our laboratory.

KEY WORDS - PCR, CNS, CSF, Aseptic meningitis, Bacterial meningitis.

Introdução

A identificação dos agentes etiológicos além de ser de fundamental importância no tratamento e prognóstico das infecções do Sistema Nervoso Central, fornece valiosas informações epidemiológicas. As técnicas convencionais de cultura, sorologia, detecção de antígenos e microscopia eletrônica são demoradas e pouco sensíveis, principalmente quando o paciente está em uso de antibióticos.

A introdução de técnicas de biologia molecular, especificamente da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem possibilitado o diagnóstico de infecções virais, bacterianas e por protozoários de maneira mais rápida e precisa, permitindo a análise de um maior número de patógenos (1).

Herpes simplex

A encefalite pelo Herpes simplex (HSV) é uma doença com alta morbidade e mortalidade, sendo seu prognóstico influenciado pela precocidade do diagnóstico e tratamento. Estudos comparando a PCR com o padrão ouro da cultura viral ou detecção de antígenos específicos após biópsia cerebral tem demonstrado que a PCR é altamente sensível e específica para o rápido diagnóstico da encefalite herpética, podendo ser positiva após o primeiro dia do início da doença. A possibilidade de um diagnóstico rápido, seguro e menos invasivo, fez com que a detecção do DNA viral pela PCR já esteja sendo considerada o padrão ouro para o diagnóstico da encefalite herpética (2;3).

Enterovírus

Os enterovírus são frequentes causadores de meningite asséptica epidêmica e podem em alguns casos apresentar sintomatologia semelhante a sepsis bacteriana. A PCR tem sido considerada o maior avanço no diagnóstico das meningites enterovirais. Esta técnica permite a obtenção de resultados em um curto espaço de tempo, contrastando com a demora da cultura viral e influenciando as decisões clínicas (4).

Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr (EBV) é ocasionalmente associado com síndromes neurológicas como encefalites, mielites transversas e Guillain Barré. A sensibilidade,

especificidade e reprodutibilidade dos resultados dependem do estágio da doença e do protocolo de PCR utilizado (5).

Varicella zoster

A meningite asséptica é uma complicação ocasional da infecção pelo vírus da Varicella zoster (VZV) especialmente em pacientes com comprometimento da imunidade celular. Foi observada a presença do DNA do VZV no líquido de pacientes imunocompetentes com meningite asséptica, mas sem lesões de pele ou dor no dermatômo (6). Esse fato sugere que o vírus pode infectar o SNC, sendo proveniente de gânglios infectados. O diagnóstico precoce do VZV pela PCR possibilita um maior sucesso terapêutico, contrastando com a dificuldade da cultura viral.

Citomegalovírus

As infecções do SNC pelo Citomegalovírus (CMV) são comuns em pacientes imunocomprometidos, principalmente doentes de AIDS e transplantados (7). O diagnóstico é dificultado pela pouca sensibilidade e demora da cultura viral e pelo comprometimento da resposta humoral. A técnica de PCR trouxe novas perspectivas para o diagnóstico das infecções do SNC, permitindo o diagnóstico rápido e atitudes terapêuticas precoces. Por ser um vírus latente e a técnica de PCR ser muito sensível, um resultado positivo não necessariamente significa infecção, sendo de fundamental importância a correlação clínica (8).

JC Papovavírus

O vírus JC causa a leucoencefalopatia multifocal progressiva, doença desmielinizante do SNC que acomete pacientes imunocomprometidos. O diagnóstico é feito através da biópsia cerebral. Estudo recente detectou pela técnica de PCR a presença do JCV no líquido em 17 de 23 pacientes com leucoencefalopatia multifocal progressiva, com uma sensibilidade e especificidade de 74% e 95,8% respectivamente, demonstrando que resultados negativos na PCR não excluem o diagnóstico (9;10).

Herpes hominis tipo 6

Publicações tem demonstrado a presença do DNA do Herpes humano tipo 6 (HHV6) identificados pela PCR em pacientes com doença neurológica associada com

convulsões febris, entretanto ainda é precoce definir o tipo de doença neurológica ocasionada por esse vírus (11;12).

Toxoplasma gondii

A toxoplasmose do SNC é muito frequente em pacientes com AIDS e se caracteriza por um quadro de encefalite geralmente acompanhada por múltiplos abscessos cerebrais. O diagnóstico é presuntivo devido a dificuldade na identificação e cultura do protozoário. A alta soroprevalência na população torna os testes sorológicos não conclusivos (13). A utilização da PCR na identificação do DNA do *Toxoplasma gondii* tem sido muito estudada e abre novas perspectivas no diagnóstico da encefalite toxoplásmica (14).

Micobactérias

A meningite tuberculosa é de difícil diagnóstico uma vez que o bacilo geralmente está presente em baixos títulos no SNC e apresenta crescimento lento em cultura. Com a PCR se tornou possível a identificação rápida das micobactérias no líquido. Vários estudos tem sido desenvolvidos para validar a PCR no diagnóstico da meningite tuberculosa, demonstrando sensibilidade de 70% e especificidade de 100% (15;16;17).

Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus sp.

Talvez o maior avanço no diagnóstico bacteriano no SNC tenha sido o desenvolvimento de primers que detectam a *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *Streptococcus sp.* Esses primers amplificam segmentos do gene 16S (RNA ribossomal), a seguir procede-se a identificação das espécies bacterianas com amplificação específica. Estudo realizado encontrou sensibilidade de 94% em amostras de líquido comprovadamente positivas. Em 5 casos com cultura negativa foram amplificados DNA bacteriano, sendo confirmado pela detecção de antígenos (18).

As infecções oportunistas tiveram uma maior importância com o advento da infecção pelo HIV. Meningites e meningo-encefalites podem ser observadas com maior frequência nos doentes de AIDS, especialmente por tuberculose, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes simplex e zoster.

A PCR é um teste extremamente rápido, sensível e específico. Vários trabalhos estão estudando a aplicabilidade da PCR no diagnóstico das infecções do SNC.

O objetivo deste estudo foi implantar em nosso serviço uma rotina para o diagnóstico molecular dos patógenos que mais frequentemente infectam o SNC.

Material e métodos

As amostras de líquido céfalo-raquidiano (LCR) recebidas no laboratório da Unidade de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram testadas para 20 agentes infecciosos, de acordo com o seguinte protocolo:

Bateria 1: Herpes simplex, Herpes zoster, Enterovírus.

Bateria 2: vírus da Linfocoriomeningite, vírus Epstein-Barr, Adenovírus, Herpes hominis tipo 6, Sarampo, Caxumba. Em imunodeficientes: *Mycobacterium sp*, Citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, vírus JC.

Bateria 3: *Listeria monocytogenes*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Leptospira interrogans*.

Bateria 4: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus sp*.

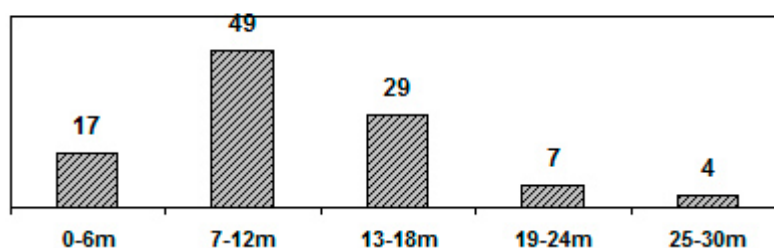
Os casos onde a suspeita clínica e os achados liquóricos fossem de meningite bacteriana foram em primeiro lugar testados com a bateria 4 para identificar a presença de DNA de *N.meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus sp*. Os casos onde a suspeita fosse de meningite ou meningo-encefalite viral ou de agente oportunista em paciente imunodeficiente seguiram a ordem do protocolo.

Os testes para vírus RNA iniciaram com a extração de 100µl de LCR pelo método de Boom (19), eliminando-se as lavagens com isotiocianato de guanidina após a primeira etapa. Esse método é rápido, de fácil realização e diminui o risco de contaminação cruzada. Os agentes com genoma DNA foram amplificados diretamente sem extração. Após detectarmos casos de inibição da amplificação do DNA passamos a extrair todas as amostras de líquor independentemente de pesquisarmos genoma RNA ou DNA. Nos testes para pesquisa de agentes DNA realizamos extração com 50µl de LCR. Todas as amostras de LCR tiveram sua rotina laboratorial realizada normalmente: bioquímica, citológico com diferencial, bacterioscópico e bacteriológico.

Utilizamos duas etapas de amplificação ou PCR “nested” para todos os agentes infecciosos estudados. Algumas reações utilizaram a combinação de “primers”, de acordo com a semelhança nas temperaturas de anelamento e na possibilidade de identificação distinta de cada agente na eletroforese. Desta maneira foram feitas as

seguintes combinações, possibilitando a pesquisa de mais de um agente na mesma reação: HSV e VZV; EBV e HHV6; LCM com sarampo e caxumba; *N. meningitidis* com *H. influenzae* e *Streptococcus sp.* Todos os demais agentes foram amplificados separadamente (Figura 1).

Figura 1 - Negativação da sorologia para HIV em crianças PCR-negativo conforme faixa etária (n=106).



As reações de PCR continham 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM tris-HCL (pH 9.0), 1,5 mM MgCl₂, 0,01% de tween (w/v), 10 mM de mistura de deoxiribonucleosídeos trifosfato (Advanced Biotechnologies Ltd.), 0,1 µM de cada “primer” específico com sequências retiradas da literatura internacional (R&D Systems Europe Ltd.) e 0,625 unidades de Taq polimerase (Advanced Biotechnologies Ltd.). Quando pesquisado genoma RNA foi realizada a transcrição para DNA em uma única reação como a descrita acima, apenas com a adição de 3,1 unidades de transcriptase reversa Mu-MLV (Advanced Biotechnologies Ltd.). Nesse último caso foi realizada uma incubação de 15 minutos à 37°C antes do início dos ciclos de amplificação realizados em termociclador 9600 da Perkin Elmer.

Para os testes com agentes de estrutura DNA utilizamos 10 µl de LCR extraído, sendo que para os agentes RNA usou-se 20 µl do RNA extraído. O volume final de cada tubo foi de 50 µl e a reação utilizou um período de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 20 segundos de anelamento na temperatura ideal de cada “primer” e 30 segundos de polimerização a 72°C. As amplificações com “primers” internos “nested” aconteceram em mistura idêntica a anterior, excetuando-se que o volume total foi de 25 µl e que 2 µl da primeira reação foi adicionado como amostra, seguindo-se de 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos de anelamento e 30 segundos de polimerização. Em cada bateria de testes utilizamos diluições de cultura dos patógenos específicos como controle positivo.

Foram empregados procedimentos para eliminar a possibilidade de contaminações como: o uso de ponteiras com filtros de barreira, três ambientes distintos para os diversos procedimentos e adição de controles negativos. Todas as amostras positivas foram confirmadas pela repetição dos testes.

Os produtos de amplificação foram detectados por eletroforese utilizando-se 10 µl da segunda reação de PCR em gel de agarose a 2%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio. A visualização foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta. Os testes demoram em média 6 horas.

Resultados

Foram testadas 281 amostras de LCR com suspeita clínica e laboratorial de meningite ou meningoencefalites assépticas. A PCR foi positiva em 18 amostras (6,4% dos casos). Os microrganismos mais prevalentes foram: *Mycobacterium sp.* (7 casos), Herpes simplex (5 casos) e Citomegalovírus (3 casos). Os demais patógenos detectados foram: Herpes humano tipo 6 (1 caso), Enterovírus (1 caso) e *Toxoplasma gondii* (1 caso). A tabela 1 mostra os resultados positivos pela técnica de PCR e sua correlação com os demais achados laboratoriais.

N	Idade	Sexo	Leuc.	% Linf.	Eritr.	Prot. mg/dl	Glic. mg/dl	PCR	Observações
1	Adulto	M	16	82	2	52	48	CMV	HIV +
2	5a	M	20	78	1	14	70	HHV6	Sorologia HSV: reagente IgG e IgM
3	Adulto	M	363	100	22	75	50	HSV	
4	4a	M	208	79	2300	429	40	Mycobactéria	ADA níveis aumentados
5	5a	M	500	*	3	528	2	Enterovírus	
6	5a	M	500	*	3	528	2	Mycobactéria	
7	Adulto	M	299	*	2	129	16	Mycobactéria	HIV +; BAAR +
8	Adulto	M	3	*	5	61	38	CMV	HIV +
9	72a	M	45	89	3	163	65	HSV	
10	28a	F	485	*	5	135	39	Mycobactéria	BAAR negativo; Cultura: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
11	34a	M	200	35	223	117	34	Mycobactéria	HIV +; BAAR negativo; Cultura: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
12	23a	M	200	87	5	308	15	Mycobactéria	Cultura: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
13	11m	M	96	78	2	158	56	HSV	Petéquias
14	28a	F	32	97	1	75	34	CMV	HIV +

15	30a	M	3	*	2	82	62	Toxoplasma	HIV +
16	27a	F	2	*	2	3730	24	Mycobactéria	HIV +; Tuberculose pulmonar; BAAR negativo
17	33a	M	900	98	6	99	63	HSV	
18	47a	M	235	100	91	334	56	HSV	

Em estudo paralelo com objetivo de validar a técnica de PCR para o diagnóstico das meningites bacterianas por *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *Streptococcus sp.* foram testadas 22 amostras líquóricas de pacientes com meningite bacteriana e 22 amostras controle.

A técnica de PCR foi positiva em 21 dos 22 pacientes com meningite bacteriana (95,4% dos casos). O *H. influenzae* foi o microrganismo mais encontrado (10 casos), seguido pelo *Streptococcus sp.* (6 casos) e *N. meningitidis* (5 casos). Em dois casos de meningite meningocócica somente a PCR foi positiva, sendo os testes culturais e sorológicos negativos. A PCR não detectou um caso de meningite por *H. influenzae* que cresceu na cultura. Todas as amostras controles foram negativas. A tabela 2 mostra os casos de meningite bacteriana com seus achados laboratoriais.

N	Idade	Sexo	Leuc.	% Neutr.	Eritr.	Prot. mg/dl	Glic. mg/dl	PCR	Observações
1	11a	M	768	100	170	292	1	N. meningitidis	Gram e cultura negativos
2	5m	F	2033	80	330	58	79	Streptococo sp.	Gram e cultura negativos; Hemocultura: Streptococo sp.
3	1m	M	120	77	8	151	1	Streptococo sp.	Gram: cocos Gram + em cadeia; Cultura: S. pneumoniae
4	9m	M	906	77	90	83	63	H. influenzae	Gram: bacilos Gram - ; Cultura: H. influenzae
5	1a	F	1936	84	960	157	21	H. influenzae	Gram: bacilos Gram - ; Cultura: H. influenzae
6	3m	M	173	30	274	105	10	H. influenzae	Gram: bacilos Gram - ; Cultura: H. influenzae
7	5m	M	1500	95	96	107	9	H. influenzae	Gram negativo; Cultura: H. influenzae
8	10a	F	516	95	3	95	3	N. meningitidis	Gram e cultura negativos
9	2m	F	1300	70	165	254	1	H. influenzae	Gram: bacilos Gram - ; Cultura: H. influenzae
10	2a	M	176	51	69	120	14	H. influenzae	Gram: bacilos Gram - ; Cultura: H. influenzae
11	9m	M	9	0	4	19	80	N. meningitidis	Gram negativo; Cultura: N. meningitidis Grupo B
12	4m	F	1008	63	50	169	5	H. influenzae	Gram e cultura negativos; Teste imunológico: H. influenzae
13	2m	M	7200	95	91	302	2	S. pneumoniae	Gram: cocos Gram + em cadeia; Cultura: S. pneumoniae

14	2m	M	229	23	29	83	36	S. pneumoniae	Gram: cocos Gram + em cadeia; Cultura: S. pneumoniae
15	12a	M	773	86	0	198	79	Streptococo sp.	Gram: cocos Gram + em cadeia; Cultura: S. pneumoniae
16	2m	F	47700	70	50	1386	1	H. influenzae	Gram: bacilos Gram - ; Cultura: H. influenzae
17	1a	F	1024	75	12	184	70	Streptococo sp.	Gram: cocos Gram +; Cultura: S. pneumoniae
18	1a	M	2197	10	384	236	1	N. meningitidis	Gram negativo; Cultura: N. meningitidis Grupo B
19	5a	M	260	88	0	187	86	N. meningitidis	Gram: diplococos Gram - ; Cultura: N. meningitidis
20	1a	M	276	88	331	105	62	H. influenzae	Gram: bacilos Gram - ; Cultura: H. influenzae
21	1a	F	1195	89	85	81	32	H. influenzae	Gram: bacilos Gram - ; Cultura: H. influenzae
22	1a	F	240	76	0	257	6	negativo	Gram: negativo; Cultura: H. influenzae

Discussão

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase por Kary Mullis e colegas em meados de 1980 possibilitou a amplificação “in vitro” de sequências específicas do ácido nucléico. Esta ferramenta da biologia molecular revolucionou quase todos os aspectos da análise de ácidos nucléicos, pois é potencialmente capaz de detectar uma única cópia presente na amostra estudada. Isto aumentou o limite de detecção da sequência pesquisada em torno de um milhão de vezes. Como resultado temos uma técnica específica e extremamente sensível, que tem sido amplamente aplicada nas mais diferentes áreas da pesquisa biológica. Talvez, o maior impacto desta técnica seja no diagnóstico das doenças infecciosas, principalmente, naquelas causadas por microrganismos não cultiváveis ou de crescimento lento (20;21).

Numerosos estudos tem avaliado a aplicabilidade da PCR no diagnóstico das infecções do SNC, especialmente por Herpes simplex, Enterovírus e *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados tem demonstrado que a PCR aumenta a sensibilidade, especificidade e rapidez do diagnóstico, permitindo uma abordagem terapêutica mais adequada.

A proposta da criação de um protocolo de PCR para identificação dos principais patógenos do SNC visa estabelecer uma rotina de investigação simplificada e coerente para o diagnóstico das infecções do SNC.

No protocolo foram incluídos 20 dos patógenos que mais comumente acometem o SNC e distribuídos por quatro baterias de acordo com a frequência de ocorrência, estado imunológico do paciente e suspeita clínica.

Foram submetidos a este protocolo 281 amostras de LCR com suspeita de meningite ou meningoencefalite asséptica, obtendo-se PCR positivo em 18 casos (6,4%). Resultados semelhantes (6,6%) foram encontrados no Oxford Public Health Laboratory (22). O patógeno detectado com mais frequência foi o *Mycobacterium sp.* (7 casos), isso provavelmente reflete a multiplicação dos casos de tuberculose em decorrência da AIDS. O segundo microrganismo mais encontrado foi o Herpes simplex (5 casos).

Dos 18 casos com PCR positiva 7 ocorreram em pacientes com AIDS. Os patógenos detectados foram: Citomegalovírus (3 casos); *Mycobacterium sp.* (3 casos) e *Toxoplasma gondii* (1 caso), todos pertencentes a bateria 2 destinada a imunodeficientes. Três desses pacientes apresentavam citologia líquórica normal.

O exame cultural do líquido é considerado o padrão ouro para o diagnóstico das infecções bacterianas do SNC, entretanto sua sensibilidade é variável caindo drasticamente com o uso de antibióticos. A utilização de uma única reação de PCR para detecção simultânea da *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *Streptococcus sp.*, principais patógenos responsáveis pelas meningites bacterianas, possibilita a rápida identificação do agente etiológico com sensibilidade superior a 90%. Foram testadas 22 amostras líquóricas de pacientes com meningite bacteriana, sendo a PCR positiva em 21 casos (95,4%). Em quatro pacientes com PCR positiva a cultura líquórica foi negativa. Em um paciente com meningite por *H. influenzae* a PCR foi negativa provavelmente pela presença no líquido de algum inibidor da reação.

Diversos estudos demonstraram que a PCR aumenta a sensibilidade, especificidade e rapidez do diagnóstico das infecções do SNC. Entretanto, problemas ainda são enfrentados como a ocorrência de resultados falso positivo devido a contaminação e falso negativo pela inibição da PCR por amostras complexas. A extrema sensibilidade da técnica também permite questionamentos em relação a obtenção de resultados positivos por patógenos latentes, o que pode limitar o valor da PCR no diagnóstico da infecção ativa (23).

A introdução da técnica de PCR em nosso laboratório otimizou o diagnóstico etiológico das infecções do SNC e tem se revelado um instrumento de grande potencial no diagnóstico das doenças infecciosas. Por ser uma tecnologia recente e em constante

aprimoramento, necessitam-se novos estudos utilizando rigorosos critérios clínicos e laboratoriais para determinar o valor preditivo positivo da PCR no diagnóstico das infecções do SNC.

Bibliografia

1. Jeffery KMJ, Bangham CRM. **Recent advances in the laboratory diagnosis of central nervous system infections.** Current Opinion in Infectious Diseases 1996, 9:132-137.
2. Guffond T, Dewilde A, Lobert P-E, Caparros-Lefebvre D, Hober D, Wattre P. **Significance and clinical relevance of the detection of herpes simplex virus DNA by the polymerase chain in cerebrospinal fluid from patients with presumed encephalitis.** Clin Infect Dis 1994, 18: 744-49.
3. Lakeman FD, Whitley RJ, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. **Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease.** J Infect Dis 1995, 171: 857-863.
4. Sawyer MH, Holland D, Aintablian N, Connor JD, Keyser EF, Waeker NJ. **Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak.** Paediatr Infect Dis J 1994, 13: 177-182.
5. Landgren M, Kyllerman H, Bergstrom T, Dotevall L, Ljungstron L, Ricksten. **Diagnosis of Epstein-Barr virus-induced central nervous system infections by DNA amplification from cerebrospinal fluid.** Ann Neurol 1994, 35: 631-635.
6. Echeverra JM, Casas I, Tenorio T, de Ory F, Martinez-Martin P. **Detection of varicella-zoster virus-specific DNA sequences in cerebrospinal fluid from patients with acute aseptic meningitis and no cutaneous lesions.** J Med Microbiol 1994, 43: 331-335.
7. Gozlan J, Amrani ME, Baudrimont M, Costagliola D, Salord JM, Duvivier C, Picard O, Meyohas M-C, Jacomet C, Schneider-Faveau V et al. **A prospective evaluation of clinical criteria and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid for the diagnosis of cytomegalovirus-related neurological diseases during AIDS.** AIDS 1995, 9: 253-260.

8. Achim CL, Nagra RM, Wang R, Nelson JA, Wiley CA. **Detection of cytomegalovirus in cerebrospinal fluid autopsy specimens from AIDS patients.** J Infect Dis 1994, 169: 623-627.
9. Fong IW, Briton CB, Luinstra KE, Toma E, Mahony JB. **Diagnostic value of detecting JC virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy.** J Clin Microbiol 1995, 33: 484-485.
10. Weber T, Turner RW, Frye S, Ruf B, Haas J, Schielke E, Pohle H-D, Lücke W, Lürer W, Felgenhauer K, Hunsmann G et al. **Specific diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by polymerase chain reaction.** J Infect Dis 1994, 169: 1138-1141.
11. Knox KK, Harrington DP, Carrigan DR. **Fulminant human herpesvirus six encephalitis in a human immunodeficiency virus-infected infant.** J Med Virol 1995, 45: 288-292.
12. Kondo K, Nagafuji H, Hata A, Tomomori C, Yamanishi K. **Association of human herpes virus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions.** J Infect Dis 1993, 167: 1197-1200.
13. Luft BJ, Remington JS. **Toxoplasmic encephalitis.** J Infect Dis 1988, 157: 1-6.
14. Weiss LM, Udem AS, Salgo M, et al. **Sensitive and specific detection of Toxoplasma DNA in an experimental murine model: Use of Toxoplasma gondii-specific cDNA and the polymerase chain reaction.** J Infect Dis 1991, 163: 180-186.
15. Liu PYF, Shi ZY, Lau YJ, Hu BS. **Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol.** Neurology 1994, 44: 1161-1164.
16. Ahuja GK, Mohann KK, Prasad K, Behari M. **Diagnostic criteria for tuberculous meningitis and their validation.** Tubercle Lung Dis 1994, 75: 149-152.
17. Lin JJ, Harn HJ, Hsu YD, Tsao WL, Lee HS, Lee WH. **Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid.** J. Neurol 1995, 242: 147-152.
18. Radstrom P, Backman A, Qian N, Kragstbjerg P, Pahlson C, Olcen P. **Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and streptococci using a seminested PCR strategy.** J Clin Microbiol 1994, 32: 2738-2744.
19. Boom R, et al. **Rapid and simple method for purification of nucleic acids.** J Clin Microbiol 1990, 28 (3): 495-503.

20. Eisenstein BI. **The polimerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis.** The New England Journal of Medicine 1990, 18: 178-183.
21. Bell J. **The polimerase chain reaction.** Immunology Today 1989, 10: 351-356.
22. Read S, Wareing S, Jeffery K, Bangham C. **Futher development of multiplex PCR assays for the laboratory diagnosis of viral meningitis and encephalitis.** PHLS Microbiology Digest 1997, 14 (4): 202-205.
23. Kitchin PA, Bootman JS. **Quality control of the polimerase chain reaction.** Medical Virology 1993, 3: 107-114.

DOENÇA CELÍACA : UMA VISÃO ATUAL

CELIAC DISEASE : AN ACTUAL VISION

Shirley Ramos da Rosa Utiyama* & Sérgio Ioshii**

***Laboratório de Imunopatologia e ** Serviço de Anatomia Patológica,
Departamento de Patologia Médica, Hospital de Clínicas da Universidade Federal
do Paraná**

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA:

**Prof. Shirley Ramos da Rosa Utiyama
Laboratório de Imunopatologia
Departamento de Patologia Médica
Setor de Ciências da Saúde
Rua Padre Camargo - 280
80069-900 - Curitiba - Pr
FAX : 041-2644191**

INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca é uma das causas mais freqüentes de diarreia crônica e defeitos no crescimento na infância (8). Ela consiste em uma intolerância permanente ao glúten em indivíduos susceptíveis e é caracterizada por uma enteropatia inflamatória da porção superior do intestino, causando má absorção e falhas no crescimento (3,10,16). A mucosa intestinal em pacientes celíacos não tratados apresenta alterações morfológicas e funcionais, com cortes histológicos evidenciando uma mucosa lisa, sem vilosidades, com alongamento e hiperplasia de criptas (3,7). Tratamento sob dieta livre de glúten resulta em recuperação clínica e de mucosa, verificando-se recidivas com o retorno de glúten na alimentação (5,8,10,16).

A Doença Celíaca é descrita predominantemente em indivíduos da raça branca, apresentando-se com maior frequência nos países anglo saxônicos e nórdicos, embora possa ser considerada de distribuição mundial. No Brasil, pelo alto índice de miscigenação da população, esta doença já foi descrita inclusive em mulatos. A Região Sul do país, caracterizada pela colonização européia, apresenta maior frequência da doença em alemães, italianos, portugueses, poloneses, ucranianos e espanhóis, entre outros.

Cereais contendo gliadina, tais como trigo, centeio, cevada e aveia são tóxicos a estes pacientes (11). A Doença Celíaca pode ser considerada como uma patologia iniciada em um indivíduo geneticamente predisposto, sem causa inicial definida, porém com uma resposta imune perpetuada pela ingestão de glúten, com conseqüente lesão tecidual órgão específica (13).

Embora inúmeros mecanismos patogênicos tenham sido sugeridos, ainda não se encontra esclarecida a fisiopatologia da Doença Celíaca. Os estudos de Lerner et al ressaltam, através de evidências indiretas, as múltiplas características de autoimunidade na Doença Celíaca, sugerindo sua inclusão na lista cada vez mais crescente de doenças autoimunes (13).

De acordo com Ferguson (5) há fortes evidências da ativação de células T na lesão clínica. A ativação celular e produção de citocinas representam diferentes componentes da enteropatia : gama interferon e IL2 influenciam as células crípticas; fator de necrose tumoral encontra-se associado com mucosas lisas, enquanto células citotóxicas e outras citocinas estão envolvidas nas severas lesões hipoplásticas. Além do que, complexos imunes IgM/IgG e injúria mediada por complemento coexistem com a hipersensibilidade tardia observada em pacientes não tratados.

A maioria das crianças com Doença Celíaca, prévia aos 2 anos de idade, apresentam um quadro clínico típico de falha no crescimento, anorexia, vômito, distensão abdominal, perda muscular, hipotonia e irritabilidade. Em crianças mais velhas e adolescentes os sintomas gastrointestinais são menos freqüentes, porém também apresentam falha no crescimento, anemia por deficiência de ferro e puberdade tardia, além de apresentarem, ocasionalmente, diabetes mellitus, artrite e úlceras aftosas recorrentes. Tal diversidade de manifestações clínicas pode levar a um diagnóstico tardio e conseqüentes complicações na vida adulta, tais como redução na fertilidade e linfomas intestinais (3,22,23).

Segundo Kotze e colaboradores, o intervalo entre o aparecimento dos sintomas e o correto diagnóstico da Doença Celíaca, em crianças, pode chegar até a 15 meses, por confundir-se com desnutrição primária e/ou parasitoses intestinais, além da pouca disponibilidade de recursos diagnósticos no Brasil. Em adultos, tanto no Brasil como em outros centros, o intervalo pode variar, segundo os autores, de 3 meses a 56 anos para chegar-se a um diagnóstico correto, quando já podem ter ocorrido repercussões severas e até irreversíveis para o estado nutricional de muitos pacientes.

CRITÉRIOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de Doença Celíaca, de acordo com os critérios da Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição, baseava-se classicamente nos seguintes pontos: 1) a Doença Celíaca é uma condição permanente de intolerância ao glúten; 2) a lesão inicial caracteriza-se por atrofia da mucosa do intestino delgado, que se recupera durante dieta sem glúten e 3) a reintrodução do glúten produz recaída clínica e histológica (29).

Para o diagnóstico histopatológico da Doença Celíaca há necessidade de submeter os pacientes a múltiplas biópsias da mucosa do intestino delgado: uma antes do tratamento, uma na fase de recuperação, durante a dieta sem glúten, e outra após o teste com reintrodução do glúten.

As alterações anatomopatológicas observadas na Doença Celíaca incluem ausência completa das vilosidades ou apenas vestígios das mesmas, epitélio de superfície cubóide, com redução ultraestrutural das microvilosidades e aumento no número de linfócitos intraepiteliais. Em muitas células superficiais pode-se observar vacúolos proeminentes de lipídios. Proporcional ao grau de lesão das vilosidades há hiperplasia com alongamento das criptas, e aumento do número de figuras de mitose nas células crípticas. Nota-se também distribuição irregular das células de Paneth e das células enterocromoafins. Na lâmina própria observa-se aumento de celularidade à custa de plasmócitos, linfócitos, eosinófilos, e às vezes polimorfonucleares. Os linfócitos intraepiteliais são do tipo T e os linfócitos da lâmina própria são principalmente do tipo B (9).

Uma ampla variação destes achados histopatológicos pode ser encontrada em pacientes com Doença Celíaca. Nas formas mais amenas, somente um discreto encurtamento das vilosidades associado com perda das microvilosidades e aumento de linfócitos intraepiteliais. Nas formas mais severas observa-se grande perda ou mesmo ausência das vilosidades associada a maior quantidade de células inflamatórias (5).

Estudos histológicos mais detalhados por imunoperoxidase (1) ressaltam ainda que além da contagem mais elevada de linfócitos intraepiteliais, observa-se nestas células uma maior expressão de receptores de células T (TCR) com cadeias gama/delta ($\gamma\delta$), tanto antes do tratamento, como durante a dieta e mesmo na reintrodução do glúten. Sugere-se que esta população constantemente elevada de células T $\gamma\delta$ positivas possa representar um importante papel na patogenicidade da Doença Celíaca (5).

O reaparecimento das vilosidades e redução da atividade inflamatória após introdução da dieta livre de glúten é processo lento e pode demorar meses.

Até poucos anos atrás, estes critérios histológicos representavam dificuldades para o paciente, seus familiares e médicos, devido inclusive ao prolongado período necessário para diagnóstico da doença, além do inconveniente causado pelas repetidas biópsias intestinais (16).

Tais dificuldades estimularam as investigações com objetivo de estabelecer métodos sorológicos que substituíssem as biópsias ou pelo menos reduzissem seu número.

Desta forma, embora as biópsias intestinais ainda representem o “gold standard” para o diagnóstico de Doença Celíaca, os rígidos critérios de diagnóstico mudaram. Pacientes com sintomas leves ou atípicos, bem como os familiares de primeiro grau de pacientes celíacos, indivíduos com deficiência seletiva de IgA, pacientes com Diabetes Mellitus Insulino Dependente e os casos de Doença Celíaca latente ou silenciosa atualmente contam com testes sorológicos de triagem (screening) bem menos invasivos do que as biópsias intestinais (2,20,21,25).

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Em relação as crianças normais, pacientes com Doença Celíaca não tratados apresentam na circulação elevados títulos de auto anticorpos contra antígenos alimentares, possivelmente relacionados ao aumento da lesão em mucosa intestinal (3). Se esses auto anticorpos representam o evento primário, levando a lesão jejunal ou se são uma consequência da injúria jejunal desencadeada pela ingestão de glúten, em indivíduos geneticamente susceptíveis, ainda não se encontra esclarecido (19). No entanto, tais anormalidades imunológicas têm sido úteis na padronização de testes sorológicos de triagem para o diagnóstico e monitorização de pacientes com Doença Celíaca (3,12,26).

De acordo com Pacht et al (16), os três marcadores sorológicos mais importantes na Doença Celíaca são: os anticorpos anti-gliadina (AGA), os anticorpos anti-reticulina (ARA) e os anticorpos anti-endomísio (EMA).

Recentemente, os anticorpos AGA foram propostos como confiáveis marcadores de Doença Celíaca e um meio útil e prático na seleção de pacientes para biópsias de intestino delgado (2). Estes anticorpos usualmente são investigados pelo método de Elisa, dosando-se IgG e IgA no soro. Segundo Challacombe, os anticorpos IgA-AGA mostram-se mais específicos para Doença Celíaca do que os anticorpos IgG-AGA, que demonstram maior sensibilidade (3).

Os anticorpos anti-reticulina (ARA) são detectados usualmente por método de Imunofluorescência Indireta (3,24). Estudos comparativos com os outros anticorpos (AGA e EMA) evidenciam que os ARA representam um teste de triagem sensível e específico para Doença Celíaca não tratada, negatizando com o tratamento e melhora histológica e retornando à positividade quando o paciente volta ao uso de glúten (3).

ANTICORPOS ANTI -ENDOMÍSIO

A pesquisa dos anticorpos anti-endomísio (EMA-IgA) representa atualmente o melhor teste de screening para Doença Celíaca, apresentando elevado grau de sensibilidade e especificidade (90-100%), segundo estudos realizados em diversas populações (2,3,16,19). Estes anticorpos foram descritos originalmente por Chorzelski et al, em 1983 (4), e pertencem primariamente à classe IgA. Sua presença é detectada no soro dos pacientes por método de Imunofluorescência Indireta, sendo que grande parte dos estudos utilizavam esôfago de macaco como substrato (7,14,16,24). Tais anticorpos dirigem-se contra a substância intermiofibrilar da musculatura lisa do esôfago, apresentando um padrão de fluorescência característico.

O alto custo das lâminas contendo cortes criostáticos de esôfago de macaco, bem como problemas éticos crescentes relacionados ao uso destes animais, passaram a representar uma limitação na pesquisa dos anticorpos EMA-IgA. Embora estes constituam o melhor teste sorológico para o diagnóstico e acompanhamento de tratamento de Doença Celíaca, em pacientes adultos e crianças, foi necessária a identificação urgente de um substrato menos oneroso e de fácil obtenção.

Desta forma, os estudos de Ladinser et al, em 1994, (12) e de Volta et al, em 1995, (28) comparando o uso de esôfago de macaco e de tecido de cordão umbilical humano, como substrato para os anticorpos EMA-IgA, permitiram solucionar tanto o aspecto econômico como o de disponibilidade de substrato na pesquisa destes anticorpos em Doença Celíaca. Os autores evidenciaram que o cordão umbilical, além da maior facilidade de obtenção, é rico em fibrilas de reticulina (endomísio) contornando as fibras de músculo liso na parede da veia e das duas artérias umbilicais, permitindo a detecção dos anticorpos EMA-IgA com segurança.

Volta et al (28) detectou 95% de positividade (n=60) para os EMA-IgA nos pacientes celíacos não tratados, tanto ao usar esôfago de macaco como cordão umbilical. Todo o grupo controle (n=200) foi negativo nos dois substratos, caracterizando 100% de especificidade dos EMA para Doença Celíaca.

As investigações de Ladinser et al (12), utilizando cordão umbilical, caracterizaram sensibilidade e correlação de 100% entre os EMA-IgA e atrofia total de vilosidades em pacientes celíacos não tratados. Os autores confirmam que o tecido humano é mais sensível do que o de primatas na pesquisa dos EMA e enfatizam a vantagem de se poder realizar um número ilimitado de testes de triagem, não invasivos, em indivíduos de alto risco, permitindo assim a identificação precoce de pacientes celíacos assintomáticos.

Pittschieler, 1996, em um estudo com 4615 indivíduos saudáveis, utilizou cordão umbilical como substrato para o EMA, constatando além de elevada sensibilidade, especificidade e baixo custo, um valor preditivo positivo de 100% para o EMA, confirmado pela biópsia intestinal (17).

Em um amplo estudo realizado na Itália (n=3783), Cataldo et al (2) comparou as determinações de IgA e IgG-AGA com EMA-IgA. No grupo de crianças celíacas não tratadas os autores demonstraram maior sensibilidade (93,8%) para os anticorpos EMA-IgA do que os anticorpos IgA-AGA (84,9%) e IgG-AGA (90,2%). A análise dos grupos controles utilizados nos estudos de Cataldo et al (indivíduos saudáveis e pacientes gastroenterológicos) evidenciaram 3,8% de positividade para os EMA-IgA em contraste a 14,9% para os anticorpos IgA-AGA e 34,3% para os anticorpos IgG-AGA. Tais dados conferiram 96,2% de especificidade para os anticorpos EMA, 85,1% para os anticorpos IgA-AGA e 65,7% para os anticorpos IgG-AGA. Em um estudo comparativo semelhante,

Sategna-Guidetti et al (19) caracterizou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade para os EMA-IgA. Tais índices também foram observados por Pacht et al (16) e por Volta et al (28).

Os vários autores citados anteriormente (2,7,16,28) deixam evidente que os níveis dos anticorpos EMA-IgA na circulação são glúten dependentes, refletindo plenamente a atividade da doença. Pacientes sob dieta livre de glúten, após um ano de tratamento, mostram-se negativos ou com baixos títulos para os EMA, ficando clara a importância de um teste não invasivo, não apenas para o diagnóstico, bem como para o seguimento da doença.

Cataldo et al evidenciam em seus estudos que os níveis de anticorpos EMA e AGA voltam a se elevar na circulação com o retorno do glúten na alimentação, indicando a reativação da doença (2).

As inúmeras investigações sorológicas em Doença Celíaca enfatizam a necessidade de simultaneamente à pesquisa dos anticorpos EMA-IgA ou AGA-IgA, dosar os níveis totais de anticorpos IgA circulantes (3,6,7). Pacientes com Doença Celíaca e Deficiência Seletiva de IgA podem apresentar resultados falso negativos na pesquisa dos EMA-IgA ou AGA-IgA (18). Os vários estudos em pacientes, familiares e grupos controles recorrem aos métodos de Turbidimetria ou Imunodifusão Radial para a pesquisa dos níveis de IgA total circulante e desta forma evitar erros de interpretação nestas circunstâncias (2,19,28).

FAMILIARES DE PRIMEIRO GRAU DE PACIENTES CELÍACOS

Diversos estudos evidenciam o crescente interesse em avaliar sorologicamente os familiares de primeiro grau de pacientes celíacos. A positividade para os diferentes anticorpos (AGA, ARA e EMA) nos familiares varia de 5 a 13%, segundo diversos autores (2,24,27). A maioria destes indivíduos são assintomáticos e apresentam elevado risco de desenvolver linfomas intestinais. A realização de um exame sorológico simples, não invasivo e de baixo custo, evidenciaria a necessidade de uma dieta livre de glúten, que sabidamente seria suficiente para reduzir o risco de tais linfomas nos familiares de pacientes celíacos.

Os estudos de Vazquez et al (24), realizados com 59 familiares assintomáticos de pacientes celíacos, evidenciam que a associação de 2 testes simultâneos (ARA e EMA) caracterizam maior sensibilidade na detecção de formas assintomáticas ou latentes de Doença Celíaca.

Considerando que os marcadores sorológicos detectam formas assintomáticas de Doença Celíaca entre familiares de primeiro grau de pacientes celíacos e como alguns destes familiares sorologicamente positivos apresentam mucosa jejunal normal, Vasquez e colaboradores, em 1996, realizaram um estudo de caráter sorológico e histológico quantitativo em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos, com o objetivo de avaliar possíveis reações falso positivas nestes indivíduos. Foram investigados os anticorpos AGA (IgG e IgA), EMA e ARA, e as biópsias foram obtidas com forceps endoscópico, da segunda porção do duodeno. Dentre 40 amostras analisadas, 7 apresentavam severa atrofia de mucosa (Doença Celíaca) e 33 eram “normais”. Neste grupo “normais”, 9 indivíduos eram sorologicamente positivos para um ou dois

anticorpos e 24 eram negativos. A densidade numérica de linfócitos intraepiteliais nas criptas, nos indivíduos sorologicamente positivos, foi significativamente maior do que aquela observada nos familiares sorologicamente negativos, e próxima daquela contagem observada nas criptas de pacientes celíacos. Com estes dados histológicos quantitativos, Vasquez concluiu que tais familiares não são sorologicamente falso positivos e devem ser considerados como indivíduos com sprue celíaco latente (25).

Troncone e col., em 1996, discutem os conceitos de Doença Celíaca “silenciosa, latente e potencial”. Os autores consideram como silenciosa, aquela forma de Doença Celíaca caracterizada por severo dano de mucosa jejunal, com ausência de sintomatologia, enquanto nas formas latente e potencial a mucosa jejunal é considerada normal, em um indivíduo sob dieta livre de glúten. Na forma latente, o paciente já apresentou em algum momento de sua vida a mucosa lisa, que recuperou-se com a dieta. Não apresenta obrigatoriamente contagem elevada de linfócitos intraepiteliais, porém a presença de anticorpos anti endomísio é preditivo de progressão para atrofia de vilosidades. Na Doença Celíaca potencial o paciente não tem, nem nunca teve alteração de biópsia jejunal, mas apresenta anormalidades imunológicas semelhantes ao paciente de Doença Celíaca, tais como anticorpos EMA e aumento de linfócitos intraepiteliais expressando receptor gama delta (21).

ESTUDOS POPULACIONAIS

Considerando que as enteropatias por sensibilidade ao glúten geralmente são mal diagnosticadas nas populações, a padronização de métodos não invasivos tem permitido que inúmeros estudos sejam realizados com o objetivo de avaliar a prevalência de anticorpos associados com Doença Celíaca em populações adultas, bem como que se determine os fatores associados a sua presença.

Mc Millan, em um estudo com 5420 indivíduos (15-65 anos) da Irlanda do Norte, verificou positividade para o EMA em 1,2% das amostras, independente do sexo, local de residência e período de coleta (14).

Pittschieler, 1996, em um estudo sorológico com 4615 adultos sadios verificou uma prevalência de anticorpos de 163/100.000 no grupo de italianos e 216/100.000 no grupo de alemães. Os autores concluíram que a pesquisa de EMA, utilizando cordão umbilical como substrato, representa melhor método de “screening” do que a pesquisa de AGA, decorrente de sua maior sensibilidade, especificidade, baixo custo e elevado valor preditivo (100%), confirmado por biópsia (17).

CONCLUSÕES

Os vários aspectos acima citados deixam evidente a importância dos avanços laboratoriais para o paciente com Doença Celíaca e familiares. A determinação dos

anticorpos anti-endomísio (IgA) atualmente representa, sem dúvida, o melhor teste sorológico para qualquer forma da doença. A elevada sensibilidade e especificidade do mesmo permite seu amplo uso tanto para o diagnóstico bem como seguimento da Doença Celiaca. Por apresentar valor preditivo positivo de 100%, um teste de EMA-IgA positivo em adulto pode, em algumas circunstâncias, evitar um diagnóstico invasivo através de biópsia intestinal. Por sua vez, a substituição de esôfago de macaco por cordão umbilical, nas reações de Imunofluorescência Indireta para o EMA, viabilizaram seu uso ilimitado como screening, representando grande vantagem tanto no aspecto de custo benefício, quanto no caráter ético relacionado ao uso de macacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ARATO, A & SAVILAHTI, E. Incidence of intestinal gamma/delta T cells in children with

- celiac disease and ulcerative colitis. *Orv Hetil*, 133 (23): 1425-32, 1992.
- 2 - CATALDO, F; VENTURA, A; LAZZARI, R; BALLI, F; NASSINBENI, G. & MARINO, V. Antiendomysium antibodies and coeliac disease: solved and unsolved questions. An Italian multicentre study. *Acta Paediatr*, 84: 1125-31, 1995.
 - 3- CHALLACOMBE, DN. Screening tests for coeliac disease. *Archives of Disease in Childhood*, 73: 3-7, 1995.
 - 4 -CHORZELSKI, T.P. SULEJ, J; TCHORZEWSKA, H; et al. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. In: Beutner, EH; Nisengard, RJ; Albini, B; eds. Defined immunofluorescence and related cytochemical methods. *New York: Ann NY Acad Sci* 1983: 325-334.
 - 5 - FERGUSON, A. New perspectives of the pathogenesis of Coeliac Disease : evolution of a working clinical definition. *Journal of Internal Medicine*, 240: 315-318, 1996.
 - 6 - FERREIRA, M; DAVIES, SL; BUTLER, M; SCOTT, D; CLARK, M & KUMAR, P. Endomysial antibody: is the best screening test for coeliac disease? *Gut*, 33: 1633-7, 1992.
 - 7- GRODZINSKI, E; JANSSON, G; SKOGH, T; STENHAMMAR, L. & FÄLTH-MAGNUSSON, K. Anti-endomysium and anti-gliadin antibodies as serological markers for coeliac disease in childhood: a clinical study to develop a practical routine. *Acta Paediatr*, 84: 294-8, 1995.
 - 8 - KOTZE, L.M.S.. Diarréias crônicas por alterações na absorção dos nutrientes. In, Kotze, L.M.S., Diarréias Crônicas. Diagnóstico e Tratamento, Medsi, Rio de Janeiro, 1a. ed., 1992. pp. 271-313
 - 9 - KOTZE, L.M.S. & PISANI, J.C. Endoscopia e biópsia per oral do intestino delgado. In, Kotze, L.M.S., Diarréias crônicas. Diagnóstico e tratamento, Medsi, Rio de Janeiro, 1ª. ed., 1992. pp 85-112.
 - 10 - KOTZE, L.M.S.. Doença Celíaca. In, Coelho, J.C.U., Aparelho Digestivo. Clínica e Cirurgia, Medsi, Rio de Janeiro, 2a. ed., 1996. pp. 477-88.
 - 11 - KOTZE, L.M.S.. Receitas para pessoas com sensibilidade ao glúten. Revinter, 1a. ed., Rio de Janeiro, 1996. pp. 160.
 - 12 -LADINSER, B.; ROSSIPAL, E. & PITTSCHIEIER, K.. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut*, 35: 776-8, 1994.
 - 13- LERNER, A; BLANK, M. & SHOENFELD, Y. Celiac disease and autoimmunity. *Israel J. Med Sci*. 32: 33-36, 1996.
 - 14- Mc MILLAN, SA; WATSON, RP; Mc CRUM, EE; EVANS, AE. Factors associated with serum antibodies to reticulin, endomysium, and gliadin in an adult population. *Gut*, 39(1): 43-47, 1996.

- 15- MEUWISSE, G.W. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand* 59:461- 463, 1970.
- 16- PATCHT, A; SINAI, N; HORNSTEIN, L; KUMAR, V; ISH-SHALOM, N. & LERNER, A. The diagnostic reliability of anti-endomysial antibody in celiac disease: the north Israel experience. *Israel J. Med. Sci.*, 31: 218-20, 1995.
- 17- PITTSCHIELER, K; LADINSER, B. Coeliac disease: screened by a new strategy. *Acta Paediatr Suppl*, 412: 42-45, 1996.
- 18- RITTMAYER, C & RHOADS, M. IgA deficiency causes false-negative endomysial antibody result in Celiac Disease. *J Paediatr Gastroenterol Nutr*, 23:504-506, 1996.
- 19- SATEGNA-GUIDETTI, C; GROSSO, S; BRUNO, M. & GROSSO, SB. Comparison of serum anti-gliadin, anti-endomysium and anti jejunum antibodies in adult celiac sprue. *J. Clin. Gastroenterol* , 20(1): 17-21, 1995.
- 20- TALAL, AH; MURRAY, JA; GOEKEN, JA; SIVITZ, WI. Celiac disease in an adult population with insulin-dependent diabetes mellitus: use of endomysial antibody testing. *Am J Gastroenterol*, 92(8): 1280-1284, 1997.
- 21- TRONCONE, R; GRECO, L; MAYER, M; PAPARO, F; CAPUTO, N; MICILLO, M; et al. Latent and potencial coeliac disease. *Acta Paediatr Suppl*, 412: 10-14, 1996.
- 22- UNSWORTH, DJ; BROWN, DL. Serological screening suggests that adult coeliac disease is underdiagnosed in the UK and increases the incidence by up to 12%. *Gut*, 35(1): 61-64, 1994.
- 23- VALDIMARSSON, T; FRANZEN, L; GRODZINSKY, E; SKOGH, T & STRÖM, M. Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected Celiac Disease and IgA anti-endomysium antibodies ? *Digestive Diseases and Sciences*, 41(1):83-87, 1996.
- 24- VASQUEZ, H; SUGAI, E; PEDREIRA; et al.. Screening for asymptomatic celiac sprue in families. *J. Clin. Gastroenterol*, 21(2):130-3, 1995.
- 25- VASQUEZ, H; CABANNE, A; SUGAI, E; FIORINI, A; PEDREIRA, S; MAURINO, E; et al. Serological markers identify histologically latent coeliac disease among first-degree relatives. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 8(1):15-21, 1996.
- 26- VOGELSANG, H; GENSER, D; WYATT, J; LOCHS, H; FERENCI, P; GRANDITSCH, G; et al. Screening for Celiac disease: a prospective study on the value of noninvasive tests. *Am J Gastroenterol*, 90(3): 394-398, 1995.
- 27- VOLTA, U.; MOLINARO, N; FRATANGELO, D. & BIANCHI, F.B. IgA Antibodies to Jejunum:specific Immunity directed agaisnt target organ of Gluten-Sensitive enteropathy. *Digestive Diseases and Sciences*, 39:1924-9, 1994.
- 28- VOLTA, U.; MOLINARO N.; FRANCESCHI, L.; FRATANGELO, D. & BIANCHI, F.B. IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for Celiac Disease screening. *Digestive Diseases and Sciences*, 40: 1902-5, 1995.

29-WALKER-SMITH, JA; GUANDALINI, S; SCHIMITZ, J; SCHMERLING, DH & VISCORPI,JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch. Dis. Child.*, 65: 90911,1990.

SUMMARY

Celiac Disease (CD) is a permanent intolerance to gluten in susceptible subjects and is one of the most common causes of chronic diarrhea and failure to thrive in infancy. Until recently, its diagnosis was based only on clinical and histological criteria. Although small-bowel histology remains the gold standard for diagnosis of CD, simple and reliable noninvasive serological screening tests have been used. Antigliadin (AGA),

reticulin antibodies (ARA) and endomysium antibodies (EMA) are found in serum samples of patients with CD. EMA have been shown a high degree of specificity and sensivity in the various phases of gluten-sensitive enteropathy, representing an excellent test for the diagnosis and follow-up of CD, as well for identification of its silent and latent forms.

KEY WORDS : Celiac Disease, gluten, endomysium antibodies, umbilical cord.

RESUMO

A Doença Celíaca (DC) consiste em uma intolerância permanente ao glúten em indivíduos susceptíveis e é uma das causas mais comuns de diarreia crônica e déficit de crescimento na infância. Até recentemente seu diagnóstico baseava-se apenas em critérios clínicos e histológicos. Embora a histologia de intestino delgado permaneça o “gold standard” para o diagnóstico de DC, testes de screening sorológico, simples, confiáveis e não invasivos tem sido utilizados. Anticorpos anti-gliadina (AGA), anti-reticulina (ARA) e anti-endomísio (EMA) são encontrados em amostras de soros de pacientes com DC. Os EMA tem evidenciado um alto grau de especificidade e sensibilidade nas várias fases das enteropatias por sensibilidade ao glúten, representando um excelente teste para o diagnóstico e seguimento de DC, bem como para a identificação de suas formas silenciosas e latentes.

PALAVRAS CHAVE : Doença Celíaca, glúten, anticorpos anti-endomísio, cordão umbilical.

Estudo Comparativo da Frequência de Marcadores Sorológicos em
Doadores de Repetição e Primários do Centro de Hematologia e
Hemoterapia do Rio Grande do Norte - **HEMONORTE**.

Comparative Study About the Frequency of Serological Markers in Donors
of Repetition and Primary of the Centro de Hematologia e Hemoterapia do
Rio Grande do Norte - **HEMONORTE**.

*Rezende de Andrade, Sandra ⁽¹⁾; Batista Neto, Manuel Josué ⁽²⁾; Barros Freire,
Telma Cassandra ⁽³⁾; Viana Costa, Isabel Cristina ⁽⁴⁾; Cavalcanti Júnior, Geraldo
Barroso (MSc) ⁽⁵⁾.*

(1) Professor Adjunto IV da Disciplina de Hematologia Aplicada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte; (2) Farmacêutico-Bioquímico, Chefe do Laboratório de Sorologia do HEMONORTE; (3) Médica Hematologista, Diretora do Departamento de Hemoterapia do HEMONORTE; (4) Técnico de Laboratório do HEMONORTE; (5) Professor Assistente I da Disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

RESUMO:

Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil sorológico dos doadores de repetição, tendo como parâmetro os resultados obtidos dos doadores primários. Foram analisadas 13.195 amostras de doadores de sangue, no período de 01/01/96 à 31/10/96. Destas, 1240 (9,39%) foram rejeitadas em decorrência da reatividade para um ou mais marcador sorológico, sendo 631 (4,78%) doadores de repetição e 609 (4,61%) doadores primários. Os resultados obtidos com os doadores de repetição referentes aos marcadores para sífilis, Doença de Chagas, e hepatite B, mostraram índices de rejeição menores que os doadores primários, conforme a literatura tem relatado. Já a rejeição motivada pela reatividade aos demais marcadores, apresentou uma maior incidência nos doadores de repetição, divergindo do preconizado pela literatura. O fato de serem doadores de repetição não significa que os mesmos apresentem um risco de rejeição menor que os doadores primários, os quais, como podemos analisar, apresentaram índices de rejeição semelhantes aos doadores de repetição.

Palavras Chaves: Doadores de Sangue, Marcadores Sorológicos.

SUMMARY:

This study had, as its aim, to evaluate the serological aspect of the repetition blood donors, having as parameters the results obtained from donors of the first time. Were analysed 13.195 samples of blood donors, from january the first, 1996 up to the thirty-one of october 1996. From those donors, 1240 (9,39%) were rejected, owing to the seropositivity for one or more serological markers, being 631 (4,78%) of repetition donors and 609 (4,61%) of donors of first time. The results obtained with the repetition donors reffering to the markers of syphilis, Chagas Disease and B hepatitis presented lower indexes of rejection than the donors of first time, according to the existing literatura. As to the rejection motivated by the reactivity of the others markers, they presented a greater incidency in the repetition donors diverging from the ones confirmed by the literature. The fact of being repetition donors does not mean that the same present a lower risk of rejection than the primary donors, that as we may be able to analyse, presented equal indexes of rejection to the repetition donors.

Key Words: Blood Donors, Serological Markers.

INTRODUÇÃO:

A triagem sorológica é um dos pilares que sustentam a segurança transfusional, juntamente com a conscientização da população acerca da responsabilidade da doação e a captação de doadores em comunidades de baixo risco para transmissão de doenças pelo sangue, uma triagem médica rigorosa e, por fim, uma racional prescrição de produtos hemoterápicos ⁽²⁾.

O Brasil é um dos poucos países do mundo a dispor de uma normatização específica para a questão do sangue, (Portaria n.º 1376 do Ministério da Saúde de 19/11/93), a qual obriga os serviços de hemoterapia a realizarem 09 (nove) testes sorológicos em cada bolsa coletada, visando detectar patógenos como o *vírus da hepatite B (HBV)*, *vírus da hepatite C (HCV)*, *vírus da imunodeficiência humana do tipo I e II (HIV-I / II)*, *vírus linfotrópico de células T humana do tipo I e II (HTLV-I / II)*, *Trypanosoma cruzi* e *Treponema pallidum* ⁽²⁾.

Sabendo das variáveis que conhecidamente interferem nos resultados dos testes sorológicos e que dentro destas variáveis a qualidade dos doadores triados é um dos fatores que mais influenciam os percentuais de positividade desses exames, realizamos este trabalho que teve como objetivo realizar um estudo comparativo entre rejeição por sororeatividade em doadores primários e de repetição atendidos no HEMONORTE.

MATERIAL E MÉTODOS:

Foram testados soros de 13.195 doadores de sangue, com idade variando entre 18 a 60 anos, no período de 01/01/96 à 31/10/96. Neste estudo, foi considerado doador de repetição aquele que doou mais de uma vez e primário aquele que doou uma única vez.

As amostras foram analisadas no laboratório de sorologia do HEMONORTE pelos seguintes marcadores: anti-HIV-1 (lisado viral - 1ª geração),

anti-HIV 1+2 (recombinante + peptídeo sintético - 3ª geração), anti-HTLV I / II (2ª geração), anti-HCV (3ª geração), anti-HBc (IgM + IgG), HBsAg (monoclonal), todos pela técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), além de *Imunofluorescência Indireta* (IFI) para *T. cruzi*, também testado pelo ELISA, *Veneral Diseases Research Laboratory* (VDRL) para *T. pallidum* e Alanina aminotransferase (ALT), pelo método colorimétrico.

De acordo com o algoritmo utilizado, os testes foram considerados reativos após repetição em duplicata das amostras inicialmente reagentes. Os resultados indeterminados, ou seja, que ficaram na zona cinza do cut-off negativo (20%), também foram considerados reativos para efeito estatístico, já que as bolsas foram descartadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A comparação em percentuais de reatividade para os diversos marcadores sorológicos e índices de rejeição de doadores de sangue é prática rotineira nos serviços de hemoterapia, a fim de buscar rotinas e estratégias que visem diminuir o descarte de bolsas de sangue.

Como teste de triagem sorológica 100% sensível (visando a segurança do receptor) e ao mesmo tempo 100% específico (visando a detecção da infectividade do doador) não existe, e a falsa negatividade é ocorrência considerada grave, a literatura mundial tem recomendado o doador de repetição como o mais seguro do ponto de vista transfusional que o primário ⁽²⁾.

No presente estudo, observamos que o percentual de reatividade no que diz respeito ao teste de triagem para a sífilis pelo VDRL (1,46%), foi semelhante ao encontrado em estudos feitos em São Paulo ^(12,15), Rio de Janeiro ^(1,18,19), e Paraná, cujos percentuais variaram de 1 a 1,46% ⁽⁶⁾.

Os valores percentuais de sororeatividade encontrados para Doença de Chagas neste hemocentro foi de 0,48%, valores estes abaixo dos encontrados no

Rio Grande do Sul ⁽⁸⁾, Paraná ⁽⁶⁾ e Rio de Janeiro ⁽¹⁹⁾, cujos percentuais variaram de 0,55% a 1,42%, sendo observado neste estudo, vantagens do doador de repetição sobre o primário em relação ao VDRL e na sorologia para Doença de Chagas.

Com relação aos exames de triagem para hepatites, podemos afirmar que o descarte de bolsas por reatividade para HBsAg (0,41%), anti-HBc (3,74%), anti-HCV (0,97%) e GPT (1,18%) neste serviço, foram inferiores que aquele praticado em outros estados do país, como São Paulo ⁽¹¹⁾, Rio de Janeiro ^(1, 18) e Paraná ⁽⁶⁾, não sendo observado neste hemocentro vantagens do doador de repetição sobre o primário em relação aos testes supracitados.

Com referência ao HTLV-I / II, podemos constatar que o nosso percentual de reatividade (0,41%) foi semelhante aos encontrados em estudos feitos em São Paulo ^(5,15) e Rio Grande do Sul ⁽⁹⁾ e inferiores aos valores encontrados nos estados do Rio de Janeiro ⁽¹⁹⁾ e Pará ^(16,17), sendo entretanto maiores que os valores encontrados no Paraná ⁽⁶⁾.

Finalmente, quanto ao HIV (0,73%), encontramos coincidência de resultados em algumas capitais da Região Sudeste como Rio de Janeiro ⁽¹⁹⁾ e São Paulo ⁽¹⁵⁾ e um menor índice nas Regiões Norte (Pará) ^(16,17) e Sul (Paraná e Rio Grande do Sul) ^(6,10).

CONCLUSÕES:

Concluimos que o nosso percentual de descarte de bolsas por reatividade na sorologia é semelhante ou menor àquele encontrado em estados das Regiões Sudeste e Sul do país.

Em decorrência dos resultados mostrados no HEMONORTE, o doador de repetição não se mostrou mais seguro que o doador primário, ao contrário do que tem relatado a literatura, sugerindo este último dado que a taxa de soroconversão para estes agentes podem estar muito elevada em nosso meio.

TABELA 01:

Frequência de Marcadores Sorológicos em Doadores de Repetição e Primários no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Rio Grande do Norte - HEMONORTE

MARCADORES SOROLÓGICOS	DOADORES DE REPETIÇÃO	DOADORES PRIMÁRIOS	TOTAL DE DOADORES
VDRL	86 (0,65%)	107 (0,81%)	193 (1,46%)
T. cruzi (IFI)	11 (0,08%)	20 (0,15%)	31 (0,23%)
T. cruzi (ELISA)	15 (0,11%)	18 (0,14%)	33 (0,25%)
HBsAg	25 (0,19%)	29 (0,22%)	54 (0,41%)
anti-HBc	211 (1,60%)	283 (2,14%)	494 (3,74%)
anti-HCV	70 (0,53%)	58 (0,44%)	128 (0,97%)
anti-HTLV I / II	30 (0,23%)	24 (0,18%)	54 (0,41%)
anti- HIV 1 (L. Viral)	42 (0,32%)	24 (0,18%)	66 (0,50%)
anti- HIV 1+2 (Rec)	21 (0,16%)	10 (0,08%)	31 (0,24%)
ALT	120 (0,91%)	36 (0,27%)	156 (1,18%)
Total de Rejeição	631 (4,78%)	609 (4,61%)	1240 (9,39%)

OBS: **VDRL** (*Veneral Diseases Research Laboratory*), **T. cruzi -IFI** (*Imunofluorescência Indireta para *Tripanossoma cruzi**), **T. cruzi -ELISA** (**Tripanossoma cruzi* pela técnica do ELISA*), **HBsAg** (*Antígeno de superfície da hepatite B*), **anti-HBc** (*anticorpos anti-core do vírus da hepatite B*), **anti-HCV** (*anticorpos anti-vírus da hepatite C*), **anti-HTLV I / II** (*anticorpos anti-vírus linfotrópico de células *T* humana do tipo I e II*), **anti- HIV 1 - L. Viral** (*anticorpos anti-HIV 1 com antígenos obtidos por lisado viral*), **anti- HIV 1+2 - Rec** (*anticorpos anti-HIV 1+2 com antígenos recombinantes*), **ALT** (*Alanina aminotransferase*)

Fonte: Laboratório de Sorologia do HEMONORTE, no período de 01/09/96 a 31/10/96.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1- AMORIM, Luiz. et al.- Prevalência de marcadores de doenças infecciosas em doadores de sangue espontâneos e de reposição: um estudo comparativo. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 404, 1996, Supl.

2- Boletim COSAH (Comissão de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde). Triagem sorológica em unidades hemoterápicas. Brasília-DF, Vol.1(5):4-10, jan.1995.

3- BOTTEON, Fábio A.G. et al.- Estudo da frequência do vírus da hepatite B em candidatos à doação de sangue no Hemocentro Regional de Londrina. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 424 - P, 1996, Supl.

4- CARVALHO, V. et al.- Prevalência da anticorpos de superfície do vírus da hepatite B em doadores anti-HBc reagentes. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 422 - P, 1996, Supl.

5- CESAR, M.A. et al.- Estudo epidemiológico de doadores soropositivo e soronegativo para anticorpos anti HTLV I/II. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 460 - P, 1996, Supl.

6- FERRARI, A.S. et al.- Comparação entre a incidência de marcadores sorológicos em doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFRN em dois períodos distintos. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 412 - P, 1996, Supl.

7- GARCIA, C.A. et al -Prevalência de Chagas repetidamente reagente (R R) e infecções associadas em doadores de sangue..*Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap.* Vol. 18: 414 - P, 1996, Supl.

8- GARCIA, C.A. et al - Prevalência de VDRL repetidamente reagente (RR) e infecções associadas em doadores de sangue. *Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap.* Vol. 18: 413 - P, 1996, Supl.

9- GARCIA, C.A. et al - Prevalência de anticorpos anti HTLVII/ II repetidamente reagente (RR) e infecções associadas em doadores de sangue *Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap.* Vol. 18: 454 - P, 1996, Supl.

10- GARCIA, C.A. et al - Prevalência de anticorpos anti HIV I/ II repetidamente reagente (RR) e infecções associadas em doadores de sangue. *Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap.* Vol. 18: 445 - P, 1996, Supl.

11- LUZZI, J.R. et al - Evolução da triagem sorológica na U.H.H. Samaritano de São Paulo nos últimos 6 anos. *Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap.* Vol. 18: 402 - P, 1996, Supl.

12- MELO, C.M.P. et al - Avaliação sorológica dos doadores de repetição e doadores de primeira vez no Serviço de Hemoterapia de São José dos Campos. *Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap.* Vol. 18: 409 - P, 1996, Supl.

13- MELO, C.M.P. et al. - HBsAg inibição, teste confirmatório para hepatite B e associação com A-HBc no Serviço de Hemoterapia de São José dos Campos. *Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap.* Vol. 18: 425 - P, 1996, Supl.

14- MELO, C.M.P. et al.- A-HBc como teste indireto suporte para o diagnóstico do HIV no Serviço de Hemoterapia de São José dos Campos. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 426 - P, 1996, Supl.

15- MELO, C.M.P. et al. - Recuperação de doadores com resultados sorológicos duvidosos na doação. Valor do ambulatório no Serviço de Hemoterapia de São José dos Campos. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 408 - P, 1996, Supl.

16- MOUTINHO, M.L. et al. - Prevalência dos marcadores sorológicos no Hemocentro Regional de Castanhal-Pará. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 407 - P, 1996, Supl.

17- MOUTINHO, M.L. et al. - Soroprevalência dos marcadores sorológicos na Fundação HEMOPA nos últimos 5 anos. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 407 - P, 1996, Supl.

18- REIS, A.M.M. et al.- Estudo retrospectivo de triagem e testes confirmatórios em doadores de sangue do Rio de Janeiro. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 403 - P, 1996, Supl.

19- REIS, A.M.M. et al.- Triagem sorológica de doadores de sangue voluntários do Serviço de Hemoterapia da Gávea. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 411 - P, 1996, Supl.

20- SAEZ-ALQUEZAR, A. et al. - Determinação da prevalência de HTLV-I /II em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. Bol. Soc. Bras. Hemat. Hemoterap. Vol. 18: 459 - O, 1996, Supl.

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS PNEUMONIAS BACTERIANAS AGUDAS NA INFÂNCIA

IMPORTANCE OF THE LABORATORY DIAGNOSIS OF ACUTE BACTERIAL PNEUMONIA IN CHILDHOOD.

Maria das Graças Alves Benfica¹, Isabel Cristina R. Araújo Cardoso¹, Geraldo Leocádio Filho¹, Cláudia Braga Vieira² & Chequer Buffe Chamone¹

1. Serviço de Metabolismo e Microbiologia/Divisão de Biologia Médica/Instituto Octávio Magalhães/Fundação Ezequiel Dias – Belo Horizonte – MG.
2. Serviço de Microbiologia/Centro Geral de Pediatria /FHEMIG – Belo Horizonte - MG.

SUMMARY:

RESUMO:

As pneumonias bacterianas na infância, são processos agudos que comprometem os alvéolos, brônquios e espaço intersticial, com características diferentes, conforme o agente etiológico, doença de base e seu estado nutricional e imunitário. As pneumonias estão entre a quinta e sétima causa de mortalidade global, particularmente na faixa etária inferior a 05 anos e acima de 65 anos,

Neste trabalho, foram selecionadas 102 amostras de líquidos pleurais de crianças com suspeita clínica de pneumonia bacteriana aguda, no ano de 1997, provenientes dos hospitais pediátricos conveniados com o Sistema Único de Saúde/Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. Estas amostras foram submetidas a três métodos analíticos: Aglutinação em Látex, Contraímuno-elektroforese e Cultura Bacteriana, com a finalidade de identificar os agentes *S. pneumoniae* e *H. influenzae* b, e objetivando estabelecer qual o método analítico mais indicado para o diagnóstico precoce das pneumonias.

Foram observados os seguintes percentuais de positividade: Látex (37,2%), Contraímuno-elektroforese (9,8%) e Cultura (11,7%), ressaltando-se portanto, a importância do diagnóstico precoce das pneumonias, aplicando-se o Teste de Aglutinação em Látex, em amostras de líquidos pleurais, previamente tratadas.

Palavras-chaves: pneumonias, mortalidade, infância, diagnóstico precoce.

The bacterial pneumonias in the childhood, are acutes process, which compromise alveolus, bronchial tube and interstice, with different characteristics in accordance with etiological agent, base illness and immunity and nutritional state. The pneumonias are between the fifth and the seventh global death rate cause, specially in the age group under five years old and over sixty five years old.

In this research 102 pleural liquid samples collected during 1997, from children with clinical suspect of acute bacterial pneumonia in pediatric hospitals of the Unique Sistem of Health (Sistema Único de Saúde – SUS), controlled by Health Secretary of Minas Gerais State (S.E.S. MG).

Samples were analysed by three different analytical methods: Latex Agglutination, Counterimmunoelectrophoresis and Bacterial Culture, to identify *S. pneumoniae* and *H. influenzae* b agents, in order to establish which analytical method is the best to be used in precocious pneumonia diagnosis.

Among 102 samples examined 37,2% were positive by the Latex Agglutination, 11,7% positive by Culture and 9,8% positive by Counterimmunoelectrophoresis. Therefore, this research emphasizes the importance of precocious pneumonia diagnosis, applying the Latex Agglutination Test in samples of pleural liquid previously treated.

Keys – words: pneumonias, death rate, childhood, precocious diagnosis.

Introdução

As infecções respiratórias das vias inferiores, particularmente as pneumonias, são processos geralmente agudos, que comprometem os alvéolos, brônquios e espaço intersticial, com características diferentes, conforme o agente etiológico, doença de base e seu estado nutricional e imunitário. (1, 2, 15).

Na maioria dos países, incluindo o Brasil, as pneumonias estão entre a quinta e sétima causa de mortalidade global, particularmente na faixa etária inferior a 5 anos e acima de 65 anos. (3, 4, 5).

De acordo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 25 a 33% da mortalidade mundial infantil é causada por infecção respiratória das vias inferiores. O Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) estima que mais de 3 milhões de crianças morrem por pneumonia aguda a cada ano, predominantemente nos países em desenvolvimento. (2, 6, 7).

No Brasil as pneumonias bacterianas agudas, segundo o Ministério da Saúde, respondem por cerca de 12% dos atendimentos pediátricos de emergência. Em relação às infecções hospitalares, as pneumonias são a segunda infecção mais comum, ultrapassadas somente pelas do trato urinário; porém são as que mais comumente causam óbitos. (4, 5, 8, 12).

A apresentação clínica das pneumonias não permite o diagnóstico etiológico preciso e, por esta razão, a terapêutica antibiótica quase sempre é iniciada empiricamente, antes de dispor de resultados de exames microbiológicos e imunológicos. (15).

Devido à evolução rápida e à gravidade da doença (14,16), os testes Imunodiagnósticos (Aglutinação em Látex e Contraímunoeletroforese) tem obtido grande importância como diagnóstico rápido e eficaz das Pneumonias Bacterianas Agudas, utilizando como amostra Líquido Pleural, para detecção dos seguintes agentes etiológicos: *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo b.

Objetivos

Comparar os percentuais de positividade entre os métodos: Aglutinação em Látex, Contraímunoeletroforese e Cultura, para diagnóstico das pneumonias bacterianas agudas na infância.

Avaliar os índices de positividade entre os Agentes Etiológicos e os métodos empregados para pneumonia bacteriana e selecionar qual a

metodologia mais adequada para o diagnóstico precoce.

Material e Métodos

Neste estudo foram selecionadas 102 amostras de Líquidos Pleurais, de crianças com suspeita clínica de pneumonia bacteriana aguda, em 1997, provenientes dos hospitais pediátricos conveniados, com o Sistema Único de Saúde, Secretaria do Estado da Saúde (SES) de Minas Gerais.

Estas amostras foram submetidas a três métodos para identificar os agentes: *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* b.

A) Teste de Aglutinação em Látex:

O Teste de Aglutinação em Látex baseia-se na reação antígeno- anticorpo, demonstrada em placa. Foram utilizados Kits Slidex- Meningite, comercializados pela Bio- Merieux- França. As amostras foram coletadas, logo após confirmação de suspeita clínica. Estas amostras de Líquidos Pleurais foram diluídas a 1:4 em EDTA, 0,1M. PH: 7,5, aquecidas a 100° C, por 5 minutos, para liberação dos antígenos polissacarídeos de *H. influenzae* b e *S. pneumoniae*. Após este tratamento, as amostras foram resfriadas e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes utilizados para o Teste de Látex. (9, 10, 11). Os antígenos polissacarídeos, reagem com as partículas de látex, sensibilizadas por anti- soros específicos. O tempo máximo da reação foi de 2 minutos e considerou-se positiva a reação em que foi visualizado, qualquer grau de aglutinação em um dos antissoros. (14).

B) Contraímunoeletroforese:

A Contraímunoeletroforese foi realizada conforme padronização do Ministério da Saúde. (12). Utilizamos antissoros provenientes do INSTITUTO ADOLFO LUTZ - SP. Baseou-se na pesquisa de anticorpos solúveis no líquido pleural. Os polissacarídeos de *H. influenzae* b apresentam carga negativa e, quando submetidos a um campo elétrico, sob determinadas condições de pH e força iônica, migram em sentido contrário. Assim, ao se encontrarem, formam uma linha de precipitação que indica positividade da reação.

C) Cultura:

As amostras de líquidos pleurais foram acondicionadas em frascos estéreis e encaminhadas, imediatamente, ao laboratório de Referência (FUNED/ BH), onde foram semeadas em meio seletivo, Ágar chocolate (ACH), utilizando a técnica do satelitismo com cepa de *S. aureus*, incubadas a 37° C, em condições de microaerofilia (5 a 10% de CO₂ e umidade). Após a incubação (18 a 24 hs.), as colônias de *S. pneumoniae* foram submetidas à Prova Presuntiva de Optoquina (Etil- Hidrocupreína Hidroclorídica), para determinar a sensibilidade das colônias suspeitas. Em caso de positividade, realizou-se o antibiograma com discos de antibióticos selecionados. Havendo crescimento de *H. influenzae*, após a prova de satelitismo positiva,

foram processados os antibiogramas, seguidos das sorotipagens.

Resultados

Das 102 amostras de Líquidos Pleurais analisadas, constatamos que, através do Teste de Aglutinação em Látex o percentual de positividade é maior, em relação aos outros métodos empregados. Os resultados obtidos foram: 37,2% (38/102) para Aglutinação em Látex; 9,8% (10/102) para Contraímunoeletroforese; 11,7% (12/102) para Cultura (tabela I).

TABELA I
Percentuais de Positividade entre os Métodos Utilizados

	LÁTEX		CIE		CULTURA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
AMOSTRAS POSITIVAS	38	37,2	10	9,80	12	11,7
AMOSTRAS NEGATIVAS	64	62,7	92	90,1	90	88,2
TOTAL	102	100	102	100	102	100

TABELA II
Índices de Positividades:
Agente Etiológico X Métodos Utilizados

AGENTE ETIOLÓGICO	LÁTEX		CIE		CULTURA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
S. pneumoniae	24	63,2	-	-	07	58,3
H. influenzae b	14	36,8	10	100	05	41,7
TOTAL	38	100	10	100	12	100

Foram demonstrados, segundo a tabela II, diferentes índices de positividade por agente etiológico, destacando-se, maior positividade detectada pelo *S. pneumoniae* no método de Aglutinação em Látex. Ressaltamos que, no método da contraímunoeletroforese, não foi testado o anti- soro para *S. pneumoniae*, o que justifica, parcialmente, a redução da positividade da técnica.

Discussão e Conclusão

O emprego das Técnicas Imunodiagnósticas (Aglutinação em Látex e Contraímunoeletroforese), para a detecção dos antígenos em crianças com pneumonia tem sido objeto de estudo de diversos autores. Os resultados obtidos por todos eles variam em função das diferentes metodologias empregadas. (13). A Aglutinação em Látex demonstrou maior positividade, pois os antígenos capsulares, polissacarídeos, solúveis no Líquido Pleural, são resistentes e persistem nas amostras, após vários dias de uso de antibióticos, ou mesmo acondicionadas e transportadas em condições inadequadas; (tabelas I e II). O Teste de Aglutinação em Látex, não substitui a cultura, pois o diagnóstico etiológico só será confirmado mediante o isolamento do agente.(10).

No método de Aglutinação em Látex as amostras foram submetidas a tratamento adequado com EDTA 0,1 M - pH 7,5, afim de remover interferentes. Após este procedimento, notou-se a diminuição de ocorrência de resultados falsos positivos, bem como a incidência de reatividade cruzada entre *S. pneumoniae* e *H. influenzae* b. Os resultados satisfatórios dependem dos métodos de preparação das amostras biológicas (9, 10).

Quanto ao método de cultura, sua positividade tem como fatores limitantes: a antibioticoterapia prévia, coleta e transporte inadequados, que inibem o crescimento bacteriano e dependem da ocorrência concomitante de bacteremia. Associa-se a isto também a necessidade desta metodologia requerer vários dias (máximo 72 horas), para se obter o resultado final e o antibiograma, quando necessário. Entretanto, sua utilização é de extrema importância em Saúde Pública, uma vez que serve para definir o perfil epidemiológico da população estudada.

Neste estudo, ressaltou-se a importância do diagnóstico precoce das pneumonias na infância,

aplicando-se o Teste de Aglutinação em Látex, em amostras de líquidos pleurais, previamente tratadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem, em especial, à Luciana Lacerda de Souza Lino pela colaboração na digitação e à Ana Cláudia Braga de Almeida Santos pela diagramatização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Organizacion Panamerican de La Salud. Infecciones respiratorias agudas em los niños. Washington - OMS, nº 493. 1985.
2. Pio, A – Acute respiratory infections in children in developeny countries: an international point of view. *Pediatric. Infect. Dis*, 5: 179 – 183, 1986.
3. Camargos, P. A. M. Infecções das Vias Aéreas Superiores. Editora Médica Científica Ltda, São Paulo, cap. 77, 889 – 907, 1985
4. Camargos, P. A. M. e Col. Látex Particle Agglutination Test in the Diagnosis of Haemophilus influenzae type b, Streptococcus pneumoniae and Neisseria meningitides A and C em infants and children. *Clin. Epidemiol.* 48(10): 1245-1250, 1995
5. Pereira – N. G.; Tavares W. Atualidades em Infecções Respiratórias – Merck Revista de Pediatria – 28:13-23,1997.
6. Shann, F. Etiology of seven pneumonia in children in development Countries. *Pediatric Infect. Dis.* 5 : 247 - 252 , 1986.
7. UNICEF/ OMS – Infecciones respiratorias agudas. *Bol of Sanit, Panan*, 98 (3): 269 – 276, 1985.

8. Reis, F. J. C. Infecções das Vias Aéreas Inferiores – Editora Médica Científica, São Paulo, cap. 78, 909 – 926, 1985.
9. Requejo, H.I. Z. e Col. Detecção de Antígenos Bacterianos em Pneumonia Aguda – Revista Hospital das Clínicas – 48 (!), 1991.
10. Requejo, H. I. Z. e Col. Immunodiagnoses of Community Acquired Pneumonia in Childhood. J. Trop. Pediatrics. 43: 208 – 212, 1997.
11. Requejo, H. I. Z. , Nascimento, CMPC., and Fahrat, C. K., Fahrat. Comparison of Counterimmunoelectrophoresis, Latex Agglutination and Bacterin Culture of Diagnosis of Bacterial Meningites, Urine, Serum and Cerebrospinal Fluid Samples. Rev. Braz. Med. Biolog. 25: 357 – 367, 1992.
12. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde , Divisão Nacional de Laboratório de Saúde Pública. Normas Técnicas para o Diagnóstico das Meningites Bacterianas; Brasília – Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 49 pg – 1986.
13. Requejo, H. I. Z. e Col. Diagnosticos Rápidos de Meningites Bacterianas pelo Teste de Látex. Rev. Lae – Haes. 82: 18 – 26, 1993.
14. Camargos. P. A. M. Doença Grave, Diagnóstico Precoces: Meningite Purulenta e Teste de Aglutinação em Partículas de Látex. Tese de Doutorado – UFMG – Belo Horizonte – setembro, 1990.
15. Marcondes, E. Pediatria Básica. 7ª ed., Rio de Janeiro, Ed. Sanvier, vol. 2. 1985.
16. Winkelstein, J.A. The Influence of Partial Treatment With Penicillin on The Diagnosis of Bacterial Meningites – J. Pediatric – 77: 619, 1970.

CONTATO: MARIA DAS GRAÇAS ALVES BENFICA

Fundação Ezequiel Dias

Divisão de Biologia Médica /Serviço de Metabolismo

R. Conde Pereira Carneiro, 80 – Bairro Gameleira

Belo Horizonte – MG CEP: 30510-010

Telefone: (031) 371-9482 FAX: (031) 371-9480

IMPORTÂNCIA E DIFICULDADES NA QUANTIFICAÇÃO DO β -hCG EM PACIENTES COM DOENÇA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL (*)

Elza Maria Hartmann Uberti ()**
Dálin Tedesco Campestrini (*)**
Maria do Carmo Fajardo Diestel ()**
Maria Elaine Lacerda (**)**
Monica Kruger Ludwig (*)**
Giovana Pereira (*)**
Cristine Bianchon (*)**
Cleber Ricachenevsky (*)**

(*) Trabalho realizado no Centro de Doenças Trofoblásticas (CDT) e no Setor de Imunologia do Laboratório Central da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - RS.

(**) Médica Obstetra da Maternidade "Mário Totta", responsável pelo CDT da ISCMPA - RS.

(***) Bioquímica do Setor de Imunologia do Laboratório Central da ISCMPA-RS.

(****) Psicóloga clínica do CDT da ISCMPA-RS

Endereço para Correspondência:

Dr^a Elza M.H. Uberti
Centro de Doenças Trofoblásticas
Pré-Natal da MMT da ISCMPA-RS
Rua Annes Dias, 285 - Porto Alegre, RS
CEP 90020-090
Fone: (051) 214.80.29
Fax: (051) 331.26.47

RESUMO

Os autores salientam as principais dificuldades (e algumas maneiras de como resolvê-las) encontradas na determinação precisa do β -hCG quantitativo, que é o marcador tumoral de maior importância no manejo das pacientes com Mola Hidatiforme e outros tipos mais graves de Doença Trofoblástica Gestacional.

PALAVRAS CHAVES

β -hCG quantitativo, Doenças Trofoblásticas Gestacionais.

SUMMARY

The authors emphasize the difficulties (and some ways of how to resolve them) founded in the precise determination of quantitative serum β -hCG levels, which is the biologic tumor marker of most importance in the management of patients with Hydatidiform Mole and others severe forms of Gestacional Trophoblastic Disease.

KEY WORDS

Quantitative β -hCG levels, Gestacional Trophoblastic Disease.

INTRODUÇÃO

A Doença Trofoblástica Gestacional (DTG) engloba um grupo de patologias tumorais derivadas da placenta humana que variam desde a da geralmente benigna Mola Hidatiforme ao altamente maligno Coriocarcinoma^{2, 3, 5}. São doenças raras, que atingem mulheres em idade reprodutiva que estão ou estiveram grávidas. Mesmo as formas mais graves de DTG têm altas chances de cura (90 a 100%)¹⁰, desde que sejam precocemente diagnosticadas e adequadamente manejadas em Centros de Referência^{17, 21, 31}. Um dos fatores responsáveis por esses excelentes índices de cura é o fato de que nesse grupo de patologias da placenta existe a secreção de altas concentrações de gonadotrofina coriônica, que é o marcador biológico específico desses tumores^{2, 7, 18, 22, 27}.

No manejo das pacientes com DTG, após o esvaziamento uterino, é fundamental o controle pós-molar^{3, 5, 17, 23, 28} que consiste em evitar gestação e fazer semanalmente uma determinação precisa dos níveis séricos do β -hCG, até serem obtidos 3 resultados “negativos” consecutivos - abaixo de 10 UI/L - (remissão da doença), quando as revisões clínico-laboratoriais passam a ser menos frequentes^{10, 23, 29}. A importância da dosagem da gonadotrofina coriônica reside no fato de que, muitas vezes, são os níveis elevados de β -hCG o primeiro sinal de que a evolução da paciente não está seguindo o curso esperado^{14, 15, 20, 24}. Na análise da curva de regressão de cada caso, que é acompanhada da curva de regressão padrão da gonadotrofina coriônica²⁴, é definida uma conduta clínica que muitas vezes envolve tratamentos agressivos com quimioterapia antineoplásica, às vezes associada com procedimentos cirúrgicos, ambos com graves repercussões emocionais^{1, 4, 12, 16, 19, 25, 26, 32}. Torna-se, pois, fundamental que os resultados desses exames laboratoriais sejam fidedignos.

Ao longo dos últimos 12 anos de acompanhamento clínico prospectivo de pacientes com DTG verificamos um número significativo de exames cujos valores diferiam muito do esperado e que, quando repetidos, não confirmavam o resultado inicial. Encontramos vários artigos na literatura abordando essas dificuldades^{7, 9, 11, 22}. Procuramos, então, identificar as causas dessas discrepâncias e as medidas para prevení-las. Esse é, portanto, o objetivo deste trabalho que visa mostrar aos colegas como entender e/ou resolver alguns desses problemas.

PACIENTES E MÉTODOS

De março de 1995 a abril de 1997, em 02 anos de avaliação prospectiva, 153 pacientes com todos os tipos de DTG acompanhadas no Centro de

Doenças Trofoblásticas (CDT) da ISCMPA realizaram 2067 dosagens séricas de β -hCG.

No protocolo de seguimento dessas pacientes ²⁸ é estabelecido que façam uma dosagem sérica basal e quantitativa da fração β da gonadotrofina, antes ou logo após o esvaziamento da Mola Hidatiforme (MH), que é o tipo mais comum de DTG, ou no momento do diagnóstico das outras formas tumorais de DTG; posteriormente, recomenda-se que as pacientes façam dosagens semanais do β -hCG até serem obtidos 3 resultados consecutivos com níveis inferiores a 10 UI/L, quando, por definição clínica é caracterizada a remissão da doença (a remissão da DTG ocorre espontaneamente em cerca de 6 a 10 semanas, em 80% das pacientes ^{3, 23}). Nessas primeiras semanas de seguimento, a quantificação precisa do β -hCG é o parâmetro mais importante de controle pós-molar, uma vez que é sabido que os níveis em “plateau” ou ascendentes da gonadotrofina coriônica freqüentemente precedem o aparecimento dos sintomas clínicos da doença complicada ^{2, 31}. A partir da remissão da doença, as revisões clínico-laboratoriais passam a ser feitas a cada 30 dias, durante pelo menos mais de 6 meses, nos casos não complicados de MH, momento em que essas pacientes recebem alta do controle pós-molar ^{3, 10, 17, 29}. (essa foi a evolução de 108 pacientes). Quando, nas outras formas tumorais de DTG, as pacientes necessitarem de tratamento quimioterápico para atingirem esses níveis baixos de gonadotrofina coriônica, o seguimento é mais longo, com revisões bimensais por mais 6 meses, seguidas de avaliações semestrais por mais 4 anos (nos casos de doença não-metastática) ou indefinidamente, quando a paciente tiver apresentado metástases à distância, ou diagnóstico histológico de coriocarcinoma ^{2, 8, 26, 31} (evolução de 45 casos).

Na evolução do acompanhamento de cada paciente, a curva individual de regressão do β -hCG é comparada com a curva logarítmica exponencial de regressão de gonadotrofina coriônica proposta por Schlaerth ²⁴ (Gráfico 1).

Durante o seguimento até a alta médica, nos casos de MH não complicada, ou até completarem o período de 1 ano com hCG em níveis considerados normais, nas formas que necessitem de quimioterapia, as pacientes são orientadas para não engravidar e a usar, como método contraceptivo, a anticoncepção oral hormonal preferentemente ^{3, 6, 17, 23, 28}.

Vários métodos de dosagem do β -hCG foram utilizados ao longo dos 12 anos; inicialmente, o método empregado foi de enzimaímmunoensaio, passando, em 1995, para quimioluminescência semi-automatizada (Magic Lite Analyser II TM - Chiron Diagnostics)e, com a evolução dos equipamentos, desde outubro de 1996, para a técnica de quimioluminescência automatizada (ACS:180 Plus - Chiron Diagnostics). Este método é um imunoensaio em “sanduiche” com tecnologia quimioluminométrica que utiliza quantidades constantes de 2 anticorpos: o 1º anticorpo, o reativo **lite**, é um anticorpo **policlonal** anti-hCG purificado por afinidade, de origem caprina, e marcado com éster de acridina; o 2º anticorpo, a **fase sólida**, é um anticorpo **monoclonal** anti-hCG, purificado, de rato, acoplado covalentemente a partículas para-magnéticas. O anticorpo monoclonal liga-se apenas à molécula intacta do β -hCG; já o anticorpo policlonal liga-se também a todas as frações β presentes na amostra. A concentração de

hCG presente na amostra é diretamente proporcional à unidade relativa de luz (RLU) detectada pelo sistema (protocolo do Kit hCG total ACS 180 Chiron Diagnostics, East Walpole, MA, USA).

É rotina dos médicos do CDT enviar aos bioquímicos do Setor de Imunologia do Laboratório Central da ISCMPA uma listagem com o nome das pacientes com DTG que colheram sangue nesse período, salientando os casos novos e/ou os com níveis sabidamente elevados de hCG. Essa relação tem por finalidade cientificar o grupo técnico que executará o teste sobre quais as amostras que precisam ser diluídas e qual a quantificação prevista, levando em consideração o ponto de vista clínico e os resultados dos exames anteriores.

RESULTADOS

As 2067 dosagens de β -hCG feitas para as pacientes do CDT representaram 34% dos 6066 exames de gonadotrofina coriônica feitos no Setor de Imunologia do Laboratório Central da ISCMPA no período estudado (Gráfico 2). Notou-se que em 10.8% das 2067 quantificações do β -hCG (225 exames), houve necessidade de repetição dos testes, por não corresponderem as expectativas previstas, em relação aos exames anteriores das pacientes e/ou à curva padrão (Gráfico 3).

Essas dosagens foram repetidas e, se ainda discordantes, solicitava-se nova coleta de material; em 187 dessas repetições (83%) os exames resultaram valores que se enquadravam com o esperado pelo quadro clínico da paciente - (Gráfico 4) (portanto, resultados falsamente anormais em 9% do total dos 2067 testes); a repetição dos outros 38 exames (17%) confirmou o resultado anômalo anterior, necessitando nova coleta de sangue para definir a conduta a seguir. Nessas 38 novas amostras, novamente em 34 testes (89,5%) os resultados seguiram a curva esperada e, em apenas 4 exames (11%) havia valor diferente do previsto (Gráfico 5) (*Total final de resultados anômalos: 4 das 2067 dosagens de hCG de pacientes do CDT (0.19%) - Gráficos 6 e 7*).

Alguns dos fatores identificados como responsáveis pelos resultados não confiáveis (falsamente altos ou baixos) são listados na Tabela 1.

Na Tabela 2 são apresentadas algumas medidas técnicas para reduzir os falsos resultados. Com esses cuidados, que vimos empregando desde novembro de 1996, conseguimos reduzir a prevalência dos resultados “anormais” iniciais de 10% (outubro/96) para 3% (fevereiro/97) (Gráfico 8).

Na tabela 3 são mostradas as diferenças entre os principais componentes detectados em alguns dos Kits designados para quantificar os níveis séricos de hCG ¹¹.

COMENTÁRIOS

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é um hormônio glicoproteico, com peso molecular de 36700 daltons, composto por 2 subunidades diferentes,

α e β , que são unidas por ligações não-covalentes^{7, 9, 18, 27} e que precisam estar combinadas para formar o hormônio biologicamente ativo^{18, 22, 27}. A subunidade α do hCG, que tem 92 aminoácidos, é produzida tanto na hipófise como na placenta e é idêntica, ou seja, tem a mesma sequência peptídica, das subunidades α do hormônio luteinizante (LH), do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio tireoestimulante (TSH). A subunidade β , que tem 145 aminoácidos, ao contrário, é única para o hCG e define a função específica da gonadotrofina coriônica^{9, 18, 22, 27}. A nível de DNA, as subunidades α e β são codificadas por gens diferentes: enquanto apenas 1 gen codifica a subunidade α , há 6 gens reguladores da subunidade β ¹¹.

Enquanto as outras gonadotrofinas têm um papel na regulação hipofisária dos testículos e ovários, o hCG está mais envolvido na estabilização do meio hormonal que é necessário na manutenção da gestação e desenvolvimento precoce do feto^{11, 18}.

Ao longo da gravidez, as células da placenta normal se diferenciam de células predominantemente citotrofoblásticas, que são observadas no início da gestação, em células sincitiotrofoblásticas que são dominantes ao término da mesma; o sincitiotrofoblasto é a maior fonte secretora de hCG intacto na circulação materna e as células menos diferenciadas do citotrofoblasto secretam não apenas o hormônio intacto como as subunidades livres α e β ⁷. Os níveis livres de subunidade α são semelhantes em pacientes com gestação normal, mola hidatiforme ou coriocarcinoma, mas os níveis livres de β -hCG, que são anormalmente elevados em pacientes com DTG, refletem a abundância de citotrofoblasto e a proliferação celular presentes nessa patologia^{7, 22, 27}. Essas observações explicam os níveis elevados de β -hCG livre verificados nas formas benignas (molas hidatiformes) e malignas (mola invasora, coriocarcinoma) das DTG^{18, 22, 27}. Em resumo, tanto as células da placenta normal como as células anormais do trofoblasto sintetizam e secretam não apenas o hCG como também as formas livres das subunidades α e β , mas sabe-se que a síntese da gonadotrofina também pode ocorrer em tecidos normais, incluindo testículos e hipófise humana e em 10 a 40% de pacientes com tumores malignos não-trofoblásticos^{11, 18, 27}. Como todos os hormônios glicoprotêicos, o hCG exerce sua atividade biológica pela ligação a receptores celulares na superfície do órgão alvo, e a subunidade β é a fração que determina a especificidade da ligação²⁷.

A técnica de radioimunoensaios para β -hCG, que foi introduzida por Vaitukaitis em 1972^{18, 22, 27} tem acentuada sensibilidade e especificidade, bem maior do que as iniciais que dosavam o hCG combinado no soro das pacientes com doença trofoblástica gestacional¹⁸. O radioimunoensaio para β -hCG, que está baseado no uso de anticorpos policlonais gerados contra a subunidade β da gonadotrofina coriônica, ainda é muito usado na maioria dos laboratórios, mas não é técnica perfeita devido à frequência baixa, porém significativa, de reatividade cruzada com o LH. O nome popular de ensaio de subunidade β não implica que se dose só a subunidade β livre; esse resultado reflete sim a combinação imunológica do hCG intacto + a subunidade β livre²⁷. Na faixa

inicial da curva padrão esse método é de escassa precisão, podendo acusar a presença de quantidades inexistentes do hormônio, com índices de resultados falso-positivos de 2,6% quando os valores de HCG situam-se entre 5 e 25 UI/L^{7, 18}. Com o uso de anticorpos monoclonais, técnica desenvolvida após a década de 80, vários imunoensaios mais sofisticados e ensaios radioimunométricos foram desenvolvidos para reconhecer especificamente o hCG e suas subunidades livres. Esses ensaios, que são tão ou mais sensíveis do que o teste do β -hCG por RIE^{7, 27}, necessitam de menos tempo para realização, não utilizam radioisótopos, têm menor coeficiente de variação por serem automatizados e maior durabilidade dos reagentes, o que implica um menor custo final na execução do exame¹¹. Todas essas técnicas possibilitam a avaliação da produção fisiológica da gonadotrofina coriônica na gravidez normal, na presença de alterações patológicas associadas com as DTG, nas gestações com fetos trissômicos, e em pacientes com tumores não-trofoblásticos^{7, 11}.

O hormônio da gravidez não existe como entidade molecular única, mas é feito de uma mistura de moléculas microheterogêneas que diferem principalmente na terminação siálica²⁷; além disso, existe uma mistura de peptídeos hCG-relacionados que podem ser obtidos da urina de mulheres grávidas e de pacientes com tumores trofoblásticos^{7, 11}.

O hCG é desativado por clivagem ("nick") na molécula ou por dissociação das subunidades. O primeiro passo dessa desativação é a clivagem da molécula, por perda de uma ligação peptídica entre os resíduos de aminoácidos 44-45 ou 46-48⁹. Por alterar a estrutura terciária do hormônio, essa clivagem diminui a atividade biológica do hormônio que passa de 40h (meia-vida do hCG intacto) para 11h (meia-vida do hCG-clivado). A dissociação das 2 subunidades libera a subunidade α livre, a subunidade β livre e a sub-unidade β livre clivada, todas com meia-vida diferentes. O fragmento β -central ("core"), que tem meia vida menor do que 10 minutos, é um produto da degradação posterior da subunidade β ^{9, 11}.

Segundo Hoerman¹¹, a variabilidade do hCG pode estar relacionada: a diferenças na estrutura primária (falta de alguns aminoácidos ou da extensão C-terminal); a variações na estrutura do carboidrato (variantes com deficiência de ácido siálico, que reduz a atividade biológica²⁷, variantes superglicosiladas que são características do hCG de origem tumoral); à clivagem da molécula por falta de ligações na estrutura peptídica; à secreção de subunidades não combinadas ou de fragmentos da molécula (β -hCG central). Uma vez que a topografia antigênica do hCG-clivado difere da do hCG íntegro, a presença de hCG-clivado pode interferir com resultados de hCGs dosados por diferentes imunoensaios (há 10 a 20% de contaminação com hCG-clivado nos vários kits para dosagem de hCG!¹¹). A ocorrência de hCG-clivado varia também com a fonte da gonadotrofina coriônica, parecendo ser mais prevalente no soro de pacientes com DTG do que no soro de outros pacientes¹¹.

A quantificação dos níveis do hCG é influenciada, portanto, por vários fatores como o grande número de componentes do hCG, os vários locais detectados para ligação antígeno-anticorpo (epítopes), diferenças generalizadas nos anticorpos dos diferentes fabricantes e mesmo lote a lote para o mesmo

fabricante, variação da sensibilidade e avidéz com que cada anticorpo reconhece um local de ligação no antígeno⁹.

A especificidade da subunidade β da gonadotrofina coriônica também não é absoluta, uma vez que há alta homologia entre o hCG e o LH que se ligam ao mesmo receptor. A principal diferença entre a subunidade β dos 2 hormônios reside nos aminoácidos da terminação carboxi da cadeia beta, aminoácidos 115-145, que estão presentes no hCG mas não no LH^{9, 18, 27}. Os anticorpos que identificam a terminação carboxi são capazes de medir o hCG mesmo em presença de altas concentrações de LH.

Com o conhecimento da natureza complexa dos produtos de degradação do hCG intacto, das meias-vidas dos produtos de degradação e das reações cruzadas dos vários produtos de degradação com os vários anticorpos passou-se a entender melhor o porquê da discrepância entre resultados da dosagem da gonadotrofina coriônica feita nos diferentes laboratórios e, num mesmo laboratório, com o mesmo Kit, entre as diferentes amostras do material (^{7, 9, 11, 18, 22, 27}). Hoerman¹¹ e Tyrey²⁷ afirmam que o melhor ensaio a ser recomendado para determinação de hCG para uso clínico, como marcador tumoral no diagnóstico e no seguimento de pacientes com DTG, é o ensaio que dose o hCG total + β -hCG, que tem a vantagem de reconhecer também o hCG-clivado e o β -hCG clivado (ver tabela 3). A diferença entre os vários Kits não mudará enquanto não houver ensaios sensíveis e específicos disponíveis para dosar um determinado componente individual do hCG¹¹. A não-especificidade entre os ensaios para determinação de hCG é maior do que geralmente é reconhecida, devido à reação cruzada com metabólitos e produtos de degradação^{9, 11}.

As amostras de soro de grávidas normais contém predominantemente hCG intacto, sendo capaz de ser detectado por todos os ensaios de anticorpos múltiplos tipo “sanduiche”⁷. As amostras de soro das pacientes com DTG são mais heterogêneas, contendo uma mistura variada de hCG intacto, de formas livres e de moléculas degradadas. Segundo Cole e cols⁷, 4 de 5 tipos de ensaio “sanduiche” para hCG não detecta total ou parcialmente todas as moléculas degradadas, podendo resultar em níveis baixos ou falso-negativos nos resultados dos testes em pacientes com DTG. Nessas pacientes, o melhor Kit é o que dose hCG total + β -hCG livre e fracionado (Ex.: Chiron Diagnostics “ACS 180”).

Durante a regressão da doença trofoblástica, os níveis de hCG total e intacto podem cair a valores muito baixos, enquanto as subunidades β livre e degradadas permanecem transitoriamente elevadas^{7, 27}; portanto, nas pacientes com DTG, resultados de ensaios que meçam β -hCG podem acusar valores elevados, cujos resultados não confirmam em exames posteriores enquanto resultados de ensaios que dosam apenas o hCG total podem resultar valores reduzidos. Como afirma Linhares¹⁸, a prudência recomenda que somente se aceite como terminada a presença de hCG quando são obtidos 3 resultados nulos (remissão da doença). Da mesma forma, para definir resistência ao tratamento da DTG é necessário obter-se no mínimo três resultados semelhantes, indicando a mesma tendência, evidenciada por níveis de hCG ascendentes ou em “plateau”^{2, 8, 10, 14, 15, 19, 31}.

O fato de que a alteração dos níveis esperados de gonadotrofina coriônica no acompanhamento das pacientes com DTG *precede* o aparecimento dos sinais clínicos de comprometimento miometrial (sangramento vaginal anormal) e de metástases à distância (dispnéia, tosse, hemoptise, etc) é o princípio do tratamento precoce das seqüelas trofoblásticas pós MH, no início do envolvimento tumoral ^{2, 3, 5, 17, 23, 31}. Os níveis séricos quantitativos do β -hCG são essenciais também no monitoramento da resposta ao tratamento quimioterápico e no diagnóstico da eventual recidiva da DTG ^{2, 14, 26}. Torna-se, portanto, fundamental que os valores obtidos na quantificação do β -hCG sejam confiáveis, uma vez que irão definir muitas vezes a conduta a seguir ^{2, 7, 10, 13, 15, 18}.

O trabalho conjunto multiprofissional que vimos desempenhando nos últimos 10 anos de acompanhamento prospectivo de pacientes com DTG, mostra como é importante e decisiva, para a paciente, a troca diária de informações clínico-laboratoriais, no sentido de serem reduzidos os falso-resultados. Com o apoio psicológico, a confiança nos exames laboratoriais, resultados esses também ansiosamente esperados pelas pacientes ¹⁶, a sensibilidade desses tumores à quimioterapia e aos esquemas de tratamento individualizado de acordo com o estadiamento clínico e os fatores de risco, temos atingido adesão a todo o seguimento proposto em mais de 97% dos casos e com cura de mais de 98% das pacientes que aderiram ao tratamento ³⁰.

Trabalhos na literatura especializada citam também alguns dos aspectos analisados ^{7, 9, 11, 13, 18, 22, 33} e recomendam que a decisão para iniciar ou trocar qualquer tratamento quimioterápico repousa em pelo menos 3 resultados de gonadotrofina coriônica com valores ascendentes em 2 semanas consecutivas ou 4 valores em “plateau” ao longo de 3 avaliações semanais ^{6, 10, 17, 20, 28}. Esses intervalos poderão ainda ser maiores, na dependência dos níveis de β -hCG a partir dos quais a curva de regressão deixou de ser decrescente ¹⁵.

O empenho na qualidade total, princípio que norteia atualmente todos os setores da ISCMPA, visando aqui especialmente a obtenção de exames confiáveis para nortear o manejo das pacientes com DTG, é que nos fez procurar identificar e corrigir as falhas que existiam desde o preparo da paciente (jejum, dieta alimentar prévia, etc), passando pela coleta e estocagem das amostras de sangue e culminando nos princípios técnicos da determinação do β -hCG. A redução dos falso-resultados iniciais, além de melhorar a confiabilidade na dosagem da gonadotrofina coriônica, implica também redução de custos.

Através da análise dos vários aspectos levantados e dos resultados obtidos neste trabalho, esperamos também ter colaborado para esclarecer os colegas de outros Centros, especialmente os que participam do manejo de pacientes com DTG.

CONCLUSÕES

Os autores salientam a importância do conhecimento, por toda equipe multiprofissional que acompanha o tratamento das pacientes com DTG, de todos os fatores que podem influenciar no resultado do β -hCG quantitativo.

Listam as principais dificuldades e reforçam também que, no controle de uma paciente em particular, os exames devem ser preferentemente feitos no mesmo laboratório, com a mesma metodologia e interpretados criteriosamente, uma vez que muitas vezes é apenas esse resultado o parâmetro que definirá a introdução ou a mudança de um tratamento quimioterápico antineoplásico e/ou associação de uma terapêutica cirúrgica também agressiva.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o empenho dos demais colegas do Laboratório Central da ISCMPA, especialmente o da auxiliar de laboratório do Setor de Imunologia, Carmen Urban Pinto; são gratos, também, às secretárias e auxiliares de enfermagem do Pré-Natal da Maternidade da ISCMPA, onde as atividades do CDT são exercidas, pela dedicação no atendimento às nossas pacientes, e ao Dr. Eurico Camargo Neto, pela revisão crítica deste trabalho e pelos preciosas sugestões que enriqueceram os comentários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bagshawe, K.D.: From methotrexate to EMA/CO. In: Szulman, A.E. and Buschsbaum, H.J. eds. Gestacional Trophoblastic Disease - Clinical Perspectives in Obstetrics and Gynecology. New York, Springer-Verlag, 1987, cap.12:127-134.
2. Bagshawe, K.D.: Choriocarcinoma: a model for tumor markers. Acta Oncol 31:99-106, 1992.
3. Belfort, P.: As síndromes da mola hidatiforme. GO 1:20-35, 1992.
4. Belfort, P. e Barros, R.B.: Aspectos Psicossociais da Neoplasia Trofoblástica Gestacional. In: Madi, J.M. e Grillo, B.M. eds. Neoplasia Trofoblástica

- Gestacional. Rio de Janeiro, Colina/Revinter; Caxias do Sul, RS, EDUCS, 1995, cap. 15:209-211.
5. Berkowitz, R.S.; Goldstein, D.P. e Bernstein, M.R.: Evolving concepts of molar pregnancy. *J. Reprod. Med.* 36:40-44, 1991.
 6. Berkowitz, R.S. e Goldstein, D.P.: Gestacional Trophoblastic Disease. In: Ryan, K.J., Berkowitz, R.S. and Barbieri, R.L. eds. *Kystner's Gynecology Principles and Practice*. 6º ed., St. Louis, Mosby, 1995. cap. 16:377-390.
 7. Cole, L.A., Kohorn, E.I. and Kim, G.S.: Detecting and monitoring trophoblastic disease: new perspectives on measuring human chorionic gonadotropin levels. *J. Reprod. Med.* 39:193-200, 1994.
 8. Feldman, S.; Goldstein, D.P. e Berkowitz, R.S.: Low-risk metastatic gestacional trophoblastic tumors. *Semin Oncol* 22:166-171, 1995.
 9. Gambino, R.: Human Chorionic Gonadotropin: multiple degradation products confound assays. *Lab. Medica International* 13 (4): 18-19, 1996.
 10. Goldstein, D.P. e Berkowitz, R.S.: Current management of complete and partial molar pregnancy. *J. Reprod. Med.* 39:139-146, 1994.
 11. Hoerman, R.: Recognition and clinical relevance of nicked human chorionic gonadotropin. *Lab. Medica International* 9 (6): 29-48, 1996.
 12. Hogg, M.; Knapp, L. E. e Lappa, C.: Psychological and emotional impact on patients and families with gestacional trophoblastic disease. *J. Reprod. Med* 36:166-178, 1991.
 13. Husa, R.O.; Rinke, M.L e Schweitzer, R.G.: Discordant human chorionic gonadotropin levels results - causes and solutions. *Obstet. Gynecol.* 65:211-218, 1985.
 14. Kennedy, A.W.: Persistent nonmetastatic gestacional trophoblastic disease. *Semin Oncol* 22:161-165, 1995.
 15. Kohorn, E.I.: Evaluation of the criteria used to make the diagnosis of nonmetastatic gestacional trophoblastic neoplasia. *Gynecol Oncol* 48:139-147, 1993.
 16. Lacerda, M.E.: Abordagem psicológica das pacientes com doença trofoblástica gestacional. Trabalho de conclusão do Curso de Psicologia da UNISINOS, São Leopoldo, RS, 1995.
 17. Lewis, J.L.: Diagnosis and management of gestacional trophoblastic disease. *Cancer* 71:1639-1647, 1993.
 18. Linhares, E: Recursos propedêuticos - dosagem de gonadotrofina coriônica. In: Madi, J.M. e Grillo, B.M. eds. *Neoplasia Trofoblástica Gestacional*. Rio de Janeiro, Colina/Revinter; Caxias do Sul, RS, EDUCS, 1995, cap.10:141-153.
 19. Lurain, J.R.: High risk metastatic Gestacional Trophoblastic Disease - current management. *J Reprod Med* 39:217-222, 1994.
 20. Morrow, C.R.: Postmolar trophoblastic disease: diagnosis, management and prognosis. *Clin Obstet Gynecol* 27:211-220, 1984.
 21. Oliveira, F.C. e Bandeira, L.F.: A importância dos centros especializados. In: Madi, J.M. e Grillo, B.M. eds. *Neoplasia Trofoblástica Gestacional*. Rio de Janeiro, Colina/Revinter; Caxias do Sul, RS, EDUCS, 1995, cap.12:187-191.
 22. Ozturk, M.: Human chorionic gonadotropin, its free subunits and gestacional trophoblastic disease. *J Reprod Med* 36:21-26, 1991.

23. Rose, R.G.: Hydatidiform mole: diagnosis and management. *Semin Oncol* 22:149-156, 1995.
24. Schlaerth, J.B. et alii: Prognostic characteristics of serum human chorionic gonadotropin titer regression following molar pregnancy *Obstet Gynecol* 58:478, 1981.
25. Soper, J.T.: Surgical therapy for gestacional trophoblastic disease. *J Reprod Med* 39:168-174, 1994.
26. Soper, J.T.: Identification and management of high risk gestacional trophoblastic disease. *Semin Oncol* 22:172-184, 1995.
27. Tyrey, I.L.: Human chorionic gonadotropin - properties and assay methods. *Semin Oncol* 22:121-129, 1995.
28. Uberti, E.M.H. et alii: Neoplasia Trofoblástica Gestacional - uma revisão e nossa experiência. *Rev Med Sta Casa, Porto Alegre*, 2:395-408, 1991.
29. Uberti, E.M.H. et alii: Controle ambulatorial pós-molar: importância da motivação continuada e do atendimento personalizado na adesão da paciente ao tratamento. *RBGO* 6:267-271, 1992.
30. Uberti, E.M.H. et alii: Centro de Doenças Trofoblásticas da ISCMPA - 10 anos de acompanhamento prospectivo de Doenças Trofoblásticas Gestacionais. Resumo das Comunicações Científicas do 46º Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, 1995, TL OP 109:80.
31. Uberti, E.M.H.; Diestel, M.C.F.; Rosa, M.W. e Lacerda, M.E.: Doença Trofoblástica Gestacional - situação atual. *Rev Med Sta Casa, Porto Alegre*, 7(14):1372-1383, 1996.
32. Wenzel, L.B. et alii: Psychological, social and sexual effects of Gestacional Trophoblastic Disease on patients and their partners *J Reprod Med* 39:163-167, 1994.
33. Wisdom, S.J. et alii: Moles and sandwiches. *Br J Obstet Gynecol* 101:455-456, 1994.

TABELA 1

Fatores identificados como responsáveis por resultados não confiáveis na determinação precisa do beta-hCG quantitativo em pacientes com DTG:

1. diferença entre "kits" utilizados, dificultando a comparação de resultados;
2. hemólise do plasma;
3. lipemia do plasma;
4. níveis séricos de LH (ainda que a reação cruzada seja rara);
5. armazenamento inadequado das amostras entre a coleta do sangue e a realização do teste;

6. necessidade de diluição do plasma quando os níveis de beta-hCG forem muito elevados (acima do limite de detecção do método utilizado).

TABELA 2

Algumas medidas técnicas para reduzir os falso-resultados da quantificação do beta-hCG (*):

* Quanto ao ***preparo do material***:

1. Deixar as amostras de sangue coagularem adequadamente antes de centrifugá-las;
2. Manter todo o tempo os tubos de ensaio ***parados*** e em ***posição vertical***;
3. Deixar as amostras de sangue em temperatura ambiente ***por não mais de 8 horas***;
4. Se o teste não tiver finalizado em 8 horas, tampar os tubos e refrigerar as amostras em temperatura entre 2 a 8°C;
5. Se o teste não tiver finalizado dentro de 48 horas, congelar as amostras a -20°C;
6. ***Congelar as amostras apenas uma vez***, e misturá-las bem após o degelo;

7. Antes de colocar as amostras no aparelho, assegurar que o plasma esteja livre de fibrina ou de outras partículas e remover todas as eventuais bolhas.

* Quanto ao **método**:

1. Misturar a fase sólida invertendo os recipientes antes de cada uso.
2. Inspeccionar visualmente os recipientes para ter certeza de que todas as partículas estão dispersas e suspensas, removendo as bolhas eventuais que tiverem aparecido.
3. Importante: ***não misturar reagentes de lotes diferentes!!***
4. Calibrar o aparelho:
 - * a cada 28 dias;
 - * quando mudar o número do lote dos reagentes;
 - * quando os controles estiverem repetidamente fora da faixa de diluição.
5. Se for necessário diluição, usar o diluidor específico (ACS Multi-Diluent 1).
6. A diluição deve ser feita apenas quando se espera valores elevados de beta-hCG em uma amostra não diluída (quando os níveis altos da gonadotrofina coriônica excederem a capacidade de leitura do kit).
7. Com a diluição da amostra na vigência de níveis altos de beta-hCG, serão evitados os resultados “acima de 1000 mUI/mL”, os quais são não informativos do ponto de vista quantitativo, não servindo, portanto, para avaliar as pacientes em controle de DTG.
8. ***É recomendado repetir o teste:***
 - * quando os níveis plasmáticos de beta-hCG quantitativo forem superiores a 300.000 mUI/mL;
 - * quando os valores forem muito baixos, pela possibilidade de reação cruzada com o LH.
9. Quando os níveis da gonadotrofinas estiverem baixos (abaixo de 100 mUI/mL), as pacientes com DTG são orientadas a evitarem alimentos gordurosos na véspera da coleta do beta-hCG quantitativo.

(*) algumas recomendações foram adaptadas e traduzidas do “Manual de Instruções” do fabricante do “Kit” de beta-hCG da Ciba-Corning.

TABELA 3

Principais componentes detectados e sítios de anticorpos (Ac) de alguns testes de gravidez designados para quantificar os níveis séricos de hCG (11):

Fabricante	Kit	Sítios de Ac	Principais componentes detectados
Abbot	IMx hCG	alfa1 beta 3	hCG total (clivado e não-clivado)
Abbot	IMx betahCG	beta 2 beta 1	hCG total (ambas as formas) + beta livre (*)
Baxter	Stratus hCG	alfabeta beta 1	hCG intato (somente o não-clivado)
Ciba Corning	ACS:180	beta 2 beta 1	hCG total (ambas as formas) + beta livre
Hybritec	Tandem-R	alfa 1 beta 1	hCG total (ambas as formas)
Organon Teknika	NML	beta 3 beta 1	hCG total (ambas as formas) + beta livre (*)
Serono	MAIAclone	alfabeta beta 1	hCG intato (somente o não-clivado)

Nota: Os ensaios IMx betahCG da Abbot e NML da Organon Teknika não detectam o hCG total que perdeu o segmento C-terminal.

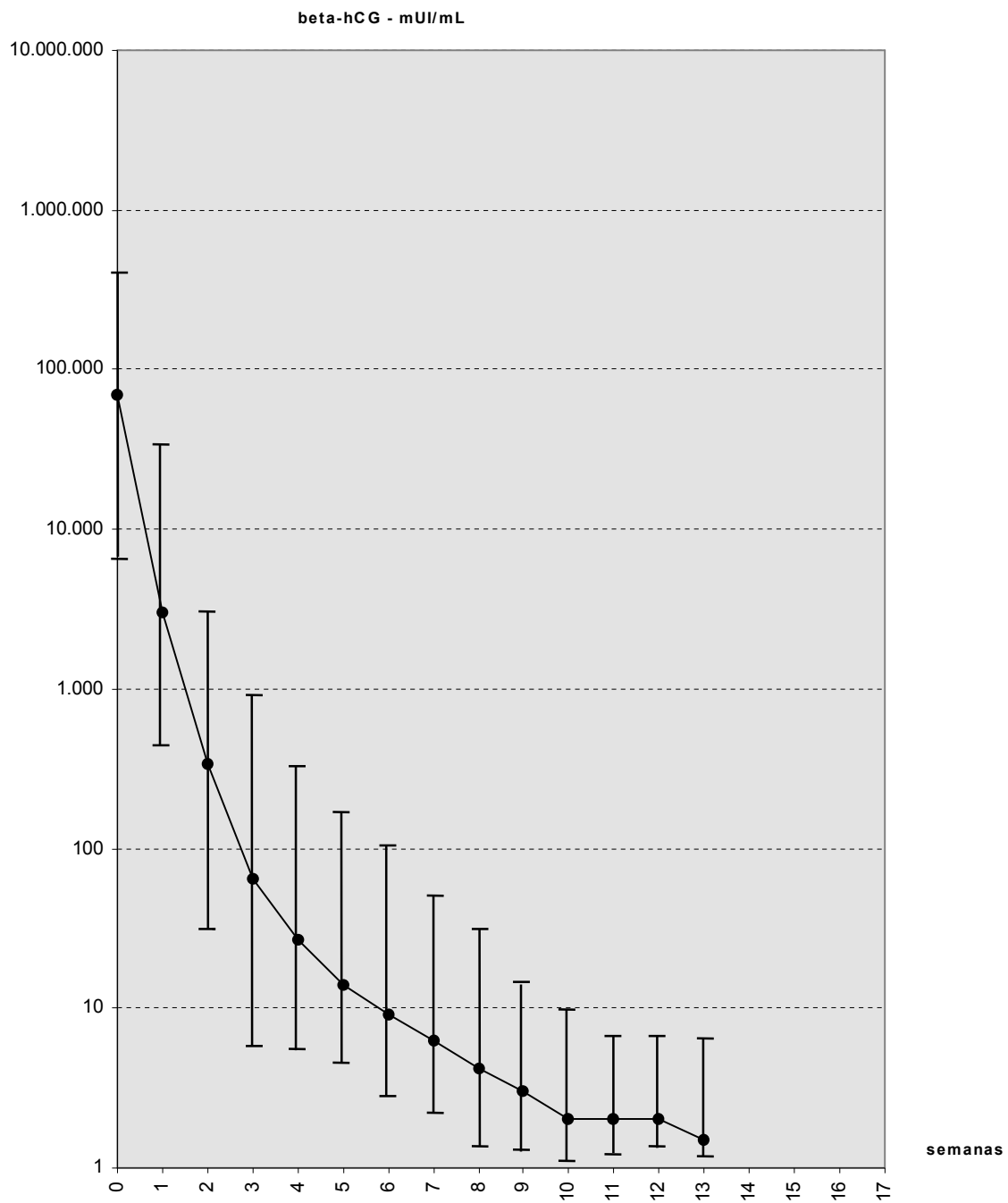
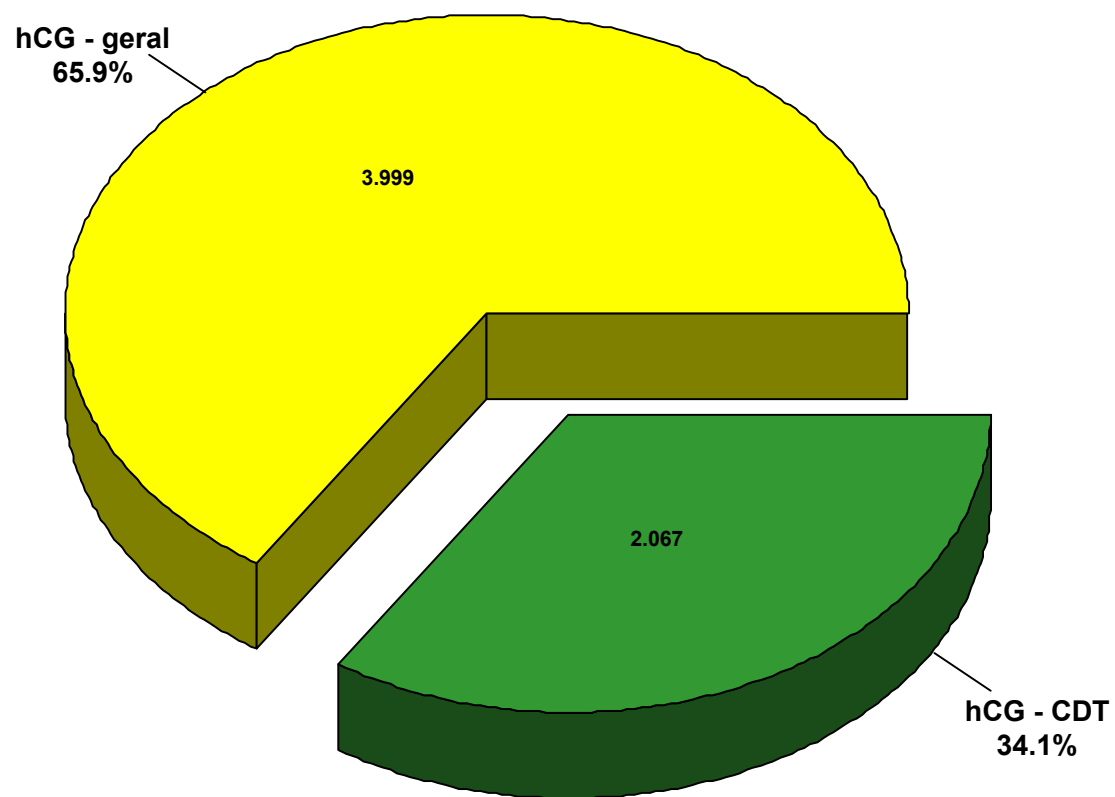


Gráfico 1 - Curva Padrão de Schlaerth

beta-hCG quantitativo

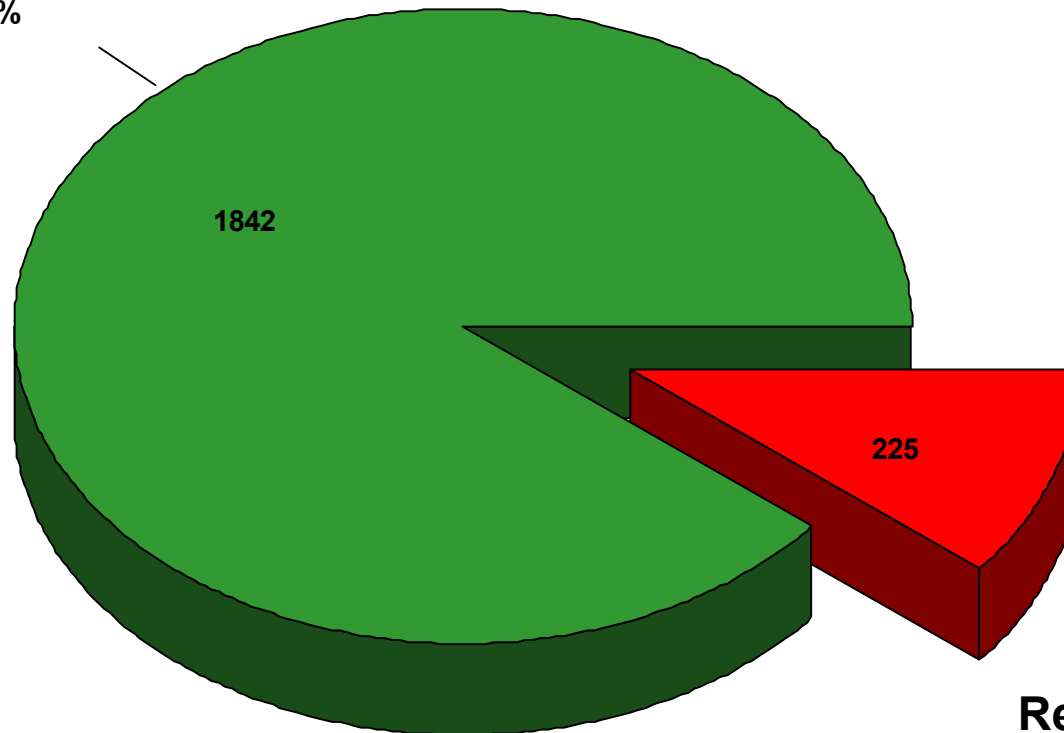


ISCMPA - 20/04/95 a 05/03/97 - n = 6066

beta-hCG quantitativo

Primeira dosagem

Res. corretos
89.1%



Res. anormais
10.9%

Repetir o teste !

CDT - Lab. ISCMPA n = 2067

beta-hCG quantitativo

Repetição do teste

Res. corretos
83.1%

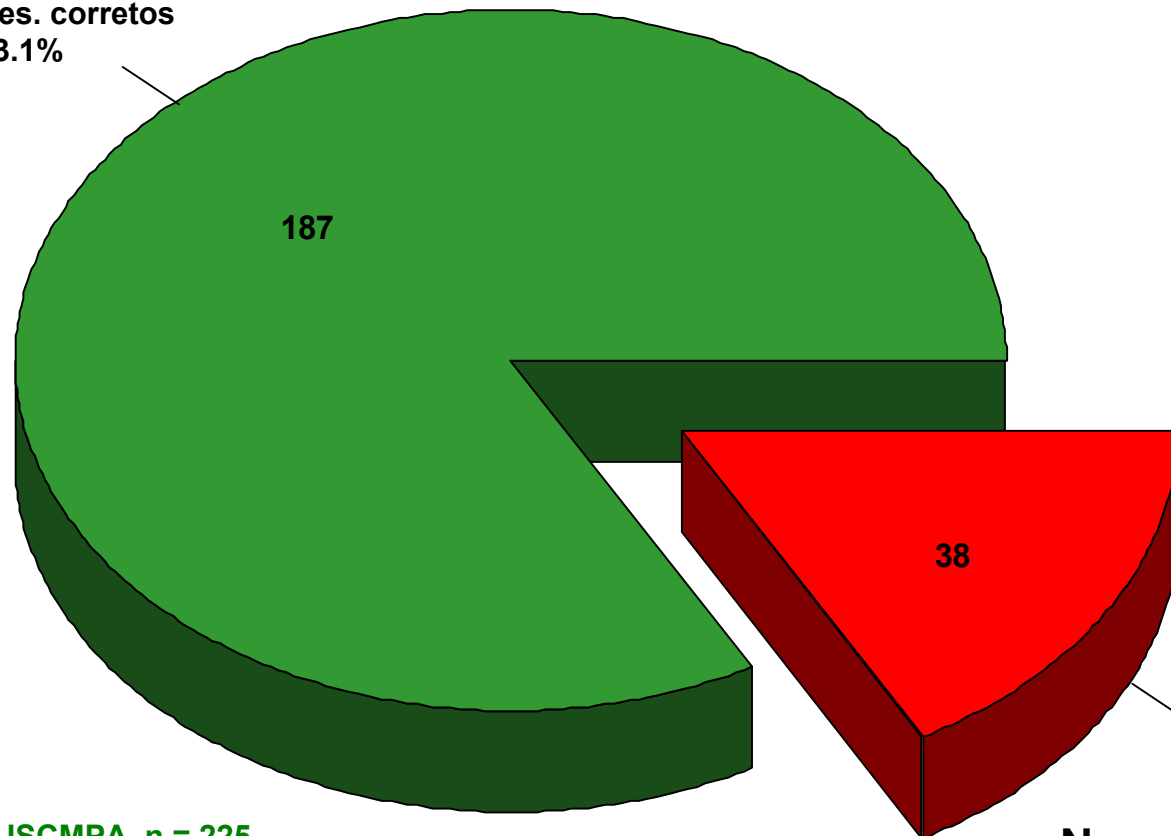
187

38

Res. anormais
16.9%

CDT - Lab. ISCMPA n = 225

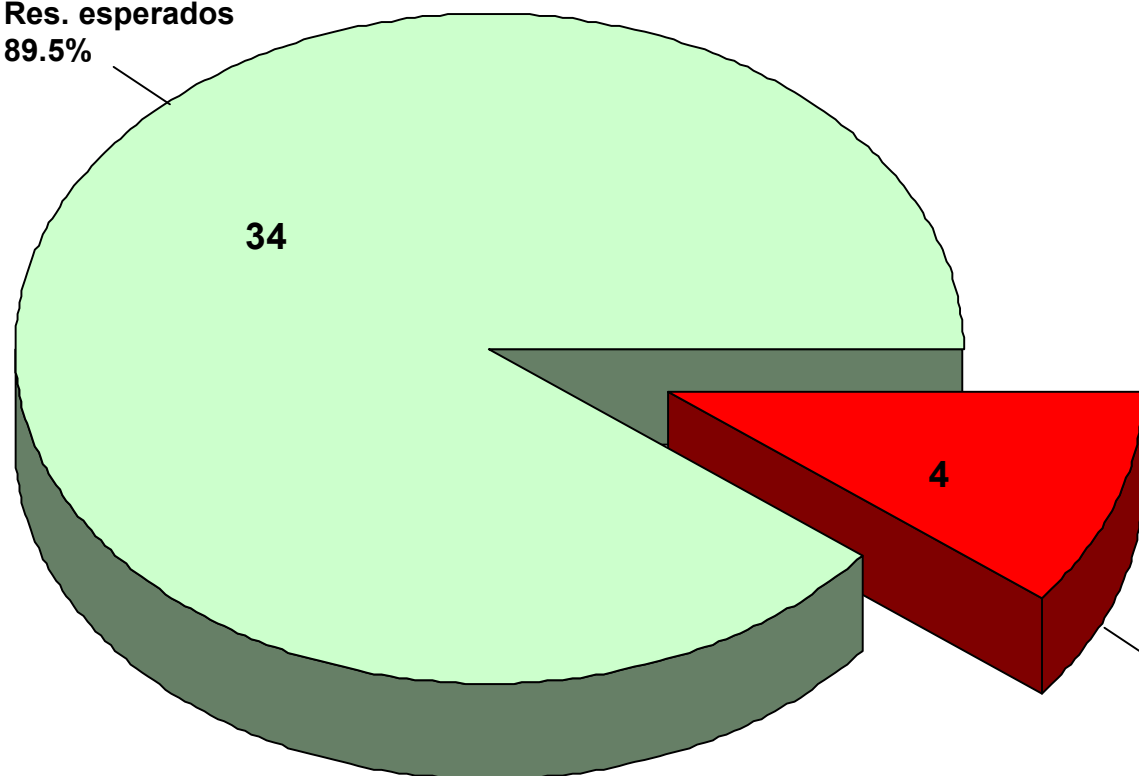
Nova amostra !



beta-hCG quantitativo

Nova amostra

Res. esperados
89.5%

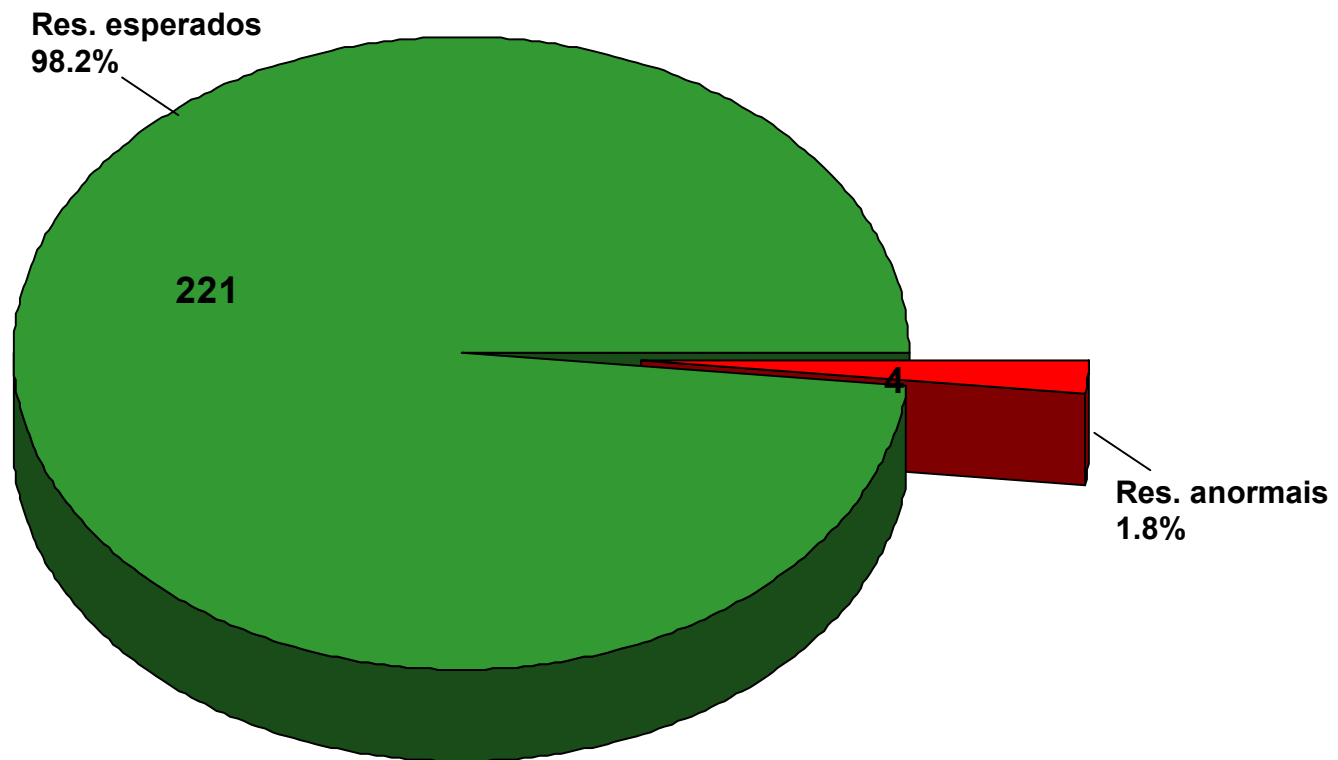


Res. anormais
10.5%

CDT - Lab. ISCMPA n = 38

beta-hCG quantitativo

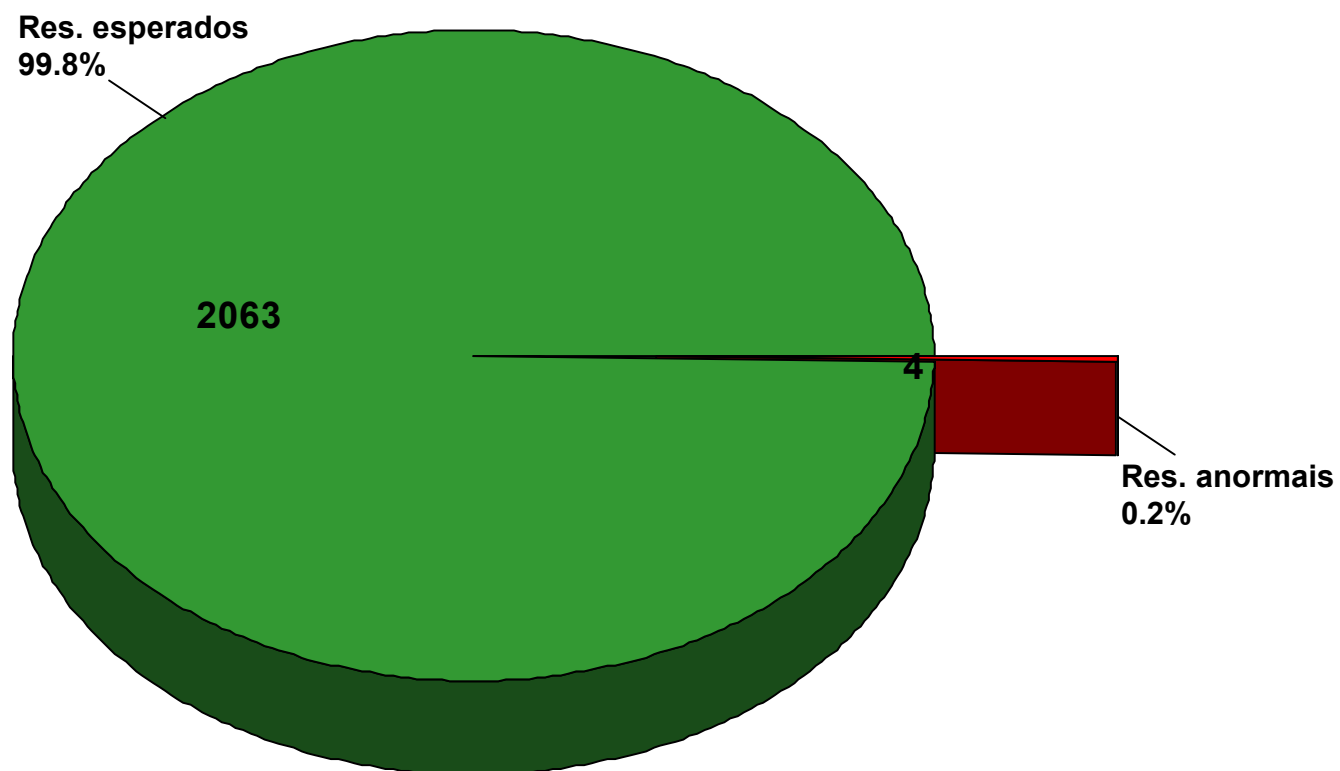
Resultados anormais finais



CDT - Lab. ISCMPA n = 225 ex. anormais iniciais

beta-hCG quantitativo

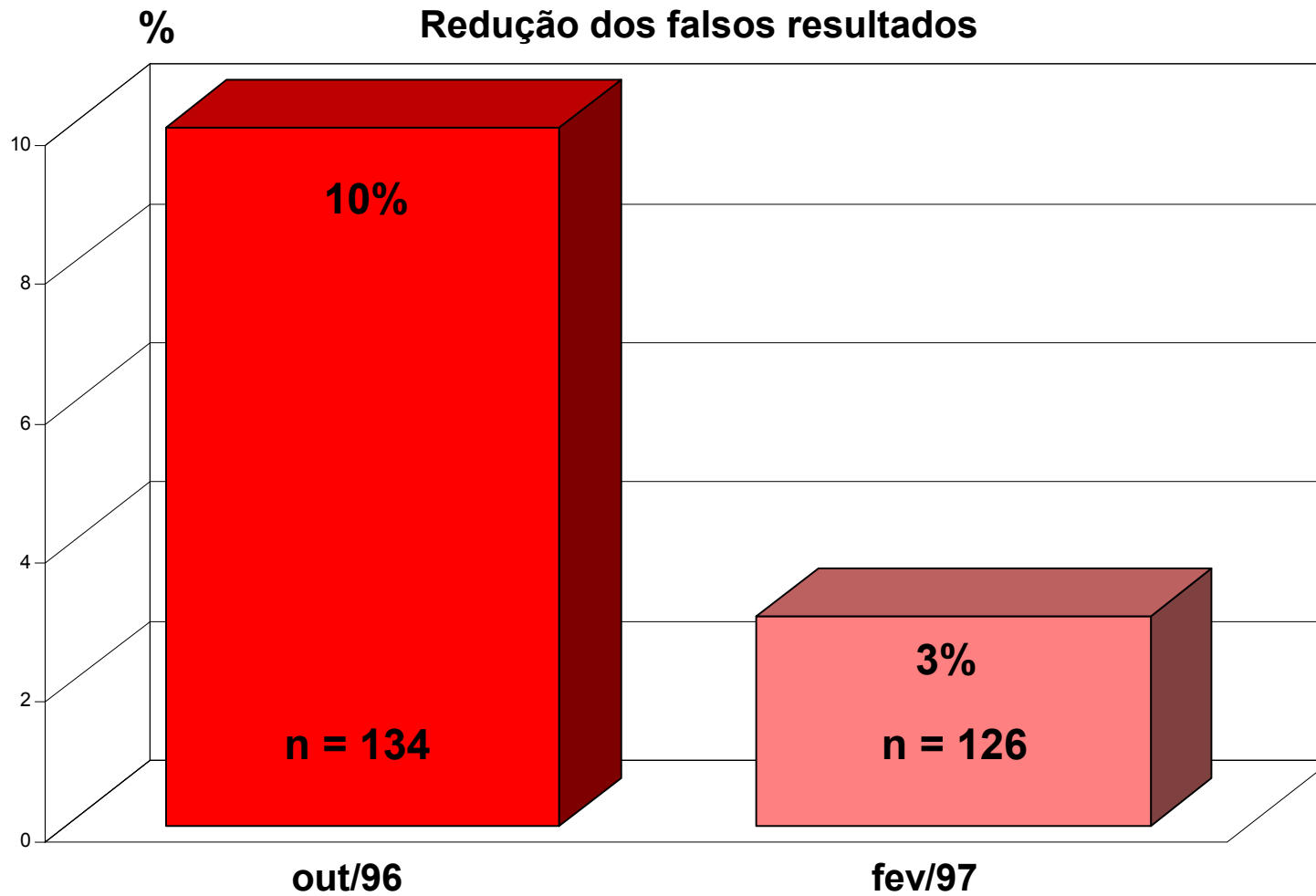
Resultados anormais finais: 4 exames



CDT - Lab. ISCMPA n = 2067 ex. anormais iniciais

beta-hCG quantitativo

Redução dos falsos resultados



CDT - Lab. ISCMPA

tc = 1,7 - p > 0,05

**Utilidade da análise de DNA por citometria
de fluxo em fluidos da cavidade corporal em
comparação com a citologia convencional**

**Utility of DNA flow cytometric analysis of body cavity fluids in
comparison with conventional cytology**

Carlos Eduardo de Queiroz Lima¹, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre¹,
Yutaka Mizushia² e Masanobu Kitagawa³

¹Disciplina de Citologia Clínica do Departamento de Farmácia - CCS –
Universidade Federal de Pernambuco; ²Departamento de Medicina Interna e

³Departamento de Patologia, Universidade de Medicina e Farmácia de
Toyama - Japão

RESUMO - A potencial utilidade da análise por citometria de fluxo em rotina de citologia diagnóstica para efusões foi avaliada com 104 amostras de fluidos da cavidade corporal. A citologia convencional mostrou não positividade (0/33) para efusões de pacientes com doenças não malignas e 45% de positividade (38/71) para efusões de pacientes com doenças malignas. Inversamente, a citometria de fluxo mostrou não positividade (0/33) de pacientes com doenças não malignas e 18% de positividade (padrão aneuploide) (13/71) com doenças malignas. Em 13 casos examinados, 8 casos (62%) mostrou idêntico padrão de ploidia de DNA entre o local da efusão e o tumor primário. A citometria de fluxo mostrou positividade em quatro amostras citologicamente negativas (3 linfomas malignos e 1 carcinoma de células claras). Nos casos com linfomas malignos, a citologia convencional mostrou 40% de positividade (4/10) e a citometria de fluxo 60% (6/10) de positividade. Estes resultados indicam que a análise de DNA de células em efusões malignas não tem valor diagnóstico como um teste de rotina, mas pode ter nos casos de linfoma maligno.

PALAVRAS CHAVE – Citometria de fluxo para DNA, líquidos orgânicos, citologia convencional.

SUMMARY - The potential utility of flow cytometric (FCM) analysis in routine diagnostic cytology for effusion was assessed with 10 samples from body cavity fluids. Conventional cytology showed no positivity (0/33) for effusions from patients with non-malignant diseases. Conversely, FCM showed no positivity (0/33) for effusions from patients with non-malignant diseases, and 18% positivity (aneuploid) (13/71) with malignant diseases. In 13 cases examined, 8 cases (62%) showed the identical DNA ploidy pattern between effusion site and primary site. FCM showed positivity in four cytologically negative samples (3 malignant lymphoma and 1 clear cell carcinoma). In cases with malignant lymphoma, conventional cytology showed 40% positivity (4/10) and FCM 60% (6/10) positivity. These results indicate that DNA analysis of cells in malignant effusions does not have a diagnostic value as a routine test, but it may have in cases of malignant lymphoma.

KEY-WORDS – DNA flow cytometry, body cavity fluids, conventional cytology.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico citopatológico em fluidos da cavidade corporal é uma tarefa difícil até para excelentes citologistas. Recentemente, alguns investigadores tem descrito que a citometria de fluxo é uma técnica rápida e útil que pode auxiliar no diagnóstico de efusões malignas. Portanto, nós temos analisado fluidos da cavidade corporal usando citometria de fluxo para avaliar a potencial da utilidade deste método no campo do diagnóstico citológico para malignidade. Neste artigo, nós mostraremos que a citometria de fluxo é um adjunto útil para o diagnóstico citológico de linfomas malignos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Amostras

a) Efusões: As amostras estudadas foram obtidas de fluidos frescos das cavidades corporais submetidos ao diagnóstico citológico convencional no Laboratório de Patologia, do Hospital da Universidade de Medicina e Farmácia de Toyama - Japão (*Toyama Medical and Pharmaceutical University Hospital*). Cento e quatro amostras de efusões de 101 pacientes foram

examinadas. As amostras incluíram 72 efusões pleural, 28 peritoneal e 5 pericárdica. Trinta e três efusões foram obtidas de pacientes com doenças não malignas e 71 efusões de pacientes com doenças malignas (Tabela 1). Nos pacientes com doenças malignas, os diagnósticos foram confirmados citopatologicamente e nos pacientes com doenças não malignas por características clínicas.

b) Tumores sólidos: Treze amostras de tecido foram obtidas de tumores primários em 42 casos de malignidade com citologia de efusões positivas (Tabela 6).

2) Citologia Convencional

Os fluidos frescos submetidos pela citologia convencional foram citocentrifugados e corados pela coloração de Papanicolaou. O diagnóstico de negatividade ou positividade para células malignas foram feitas nestas amostras.

3) Preparação de amostras para análise por citometria de fluxo

As amostras de efusão foram preparadas pelo método de Vindelov^{5,6} e colaboradores. Resumidamente, as amostras foram centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento das células era suspenso em tampão de citrato com densidade celular de aproximadamente $2,5 \times 10^3/\text{ml}$ em tubo de propileno. As células eram armazenadas a -80°C até análise.

As amostras de tumores sólidos em blocos embebidos em parafina foram preparadas pelo método de Hedley⁷ e colaboradores com pequenas modificações. Resumidamente, quatro seções de 50 μm foram cortadas, desparafinizadas com xilol, reidratadas numa seqüência de 100, 95, 70 e 50% de etanol, e tratadas com pepsina. Os núcleos isolados foram, então, processados da mesma maneira como nas amostras de efusão. As amostras foram enviadas para análise de citometria de fluxo com um mês depois da armazenagem.

4) Análises por citometria de fluxo

As amostras foram imersas rapidamente em banho-maria a 37°C e então expostas a soluções contendo detergente e ribonuclease. Em seguida, elas foram coradas com iodeto de propidium, filtradas através de uma malha de

nylon de 30 μ m e corridas num citômetro de fluxo Epics Profile II (Coulter, Hialch, FL, USA). Em volta de 10.000 células foram avaliadas em cada amostra e os histogramas feitos. O pico diplóide foi identificado usando células diplóides normais como controle interno. A ploidia de DNA foi determinada como aneuplóide quando mais de um pico G0/G1 com no mínimo 10% de células analisadas ou quando um distinto pico peridiplóide era evidente. O valor máximo aceito como coeficiente de variação para picos diplóides era 8%. Os padrões de ploidia de DNA foram categorizados como diplóide (normal), aneuplóide (anormal) ou duvidoso.

5) Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o teste X^2 .

RESULTADOS

1) Citologia convencional e análises por citometria de fluxo em cada fluido da cavidade corporal

Em efusões de pacientes com doenças não malignas, nenhuma amostra mostrou citologia positiva e padrão de DNA aneuplóide (Tabela 2). Inversamente, em efusões de pacientes com doenças malignas, 45% (38/71)

mostraram citologia positiva e 18% (13/71) mostraram padrão de DNA aneuplóide. Vinte e nove amostras apresentaram positividade somente na citologia, e quatro amostras somente na citometria de fluxo (Tabela 3).

2) Incidência de positividade em órgãos primários e em tipos histológicos de malignidades

A incidência de positividade para citologia convencional e para citometria de fluxo foi estudada em cada órgão primário (Tabela 4) e em cada tipo histológico de malignidade (Tabela 5). O câncer de fígado e canal biliar, e, câncer de esôfago mostraram baixa percentagem de positividade (0% e 17%, respectivamente). O padrão de DNA aneuplóide foi observado somente em câncer de estômago (2/12), câncer de pulmão (4/11), câncer de rins (1/1) e linfoma maligno (6/10).

Houve uma diferença significativa na incidência do padrão DNA aneuplóide entre tipos epitelial e não epitelial de malignidade (12% vs 50%, $p < 0,001$). Histologicamente, o padrão de DNA aneuplóide foi observado principalmente em adenocarcinoma (6/43 = 14%) entre os tipos epitelial de malignidade, e linfoma maligno (6/10 = 60%) entre malignidades hematopoiéticas.

3) Ploidia de DNA entre locais primários e locais de efusão

De 42 casos malignos com efusão citologicamente positiva, 13 tumores sólidos primários foram avaliados por citometria de fluxo (Tabela 6). Nos 13 casos, 8 mostraram DNA idêntico entre o local de efusão e o tumor primário. Entretanto, 5 casos mostraram padrão de DNA diferentes: diplóide e aneuplóide no caso 9, e aneuplóide e diplóide nos casos 10 a 13 (Fig. 1).

DISCUSSÃO

Alguns investigadores^{1,3,8} descrevem que a rápida e quantitativa análise em citometria de fluxo para fluidos da cavidade corporal pode ser um adjunto útil para o diagnóstico citopatológico convencional. Entretanto, outros^{9,10} reportam que a citometria de fluxo tem um papel limitado, devido sua baixa sensibilidade para este tipo de amostra. Portanto, nós avaliamos neste estudo, a potencial utilidade da análise de citometria de fluxo de DNA em citologia diagnóstica rotineira para efusões. Isto é, “quais as vantagens da

citometria de fluxo comparadas com a citologia convencional existente?”. Em fluidos da cavidade corporal de pacientes com doenças malignas, a citologia convencional mostrou 45% de positividade (38/71) e a citometria de fluxo, 18% de positividade (aneuplóide) (13/71). Proporcionalmente, a positividade para a citometria de fluxo foi bem menor do que na citologia convencional. A principal razão para a baixa positividade foi especulada sendo devido à diluição de células aneuplóides de células diplóides nas efusões, como mostrado por Elsheikh et al.⁸ Curiosamente, nos casos de linfoma maligno, a proporção de positividade foi maior na citometria de fluxo (60%) do que na citologia (40%). A citometria de fluxo mostrou aneuploidia em três amostras citologicamente negativas de paciente com linfoma maligno. Nossa conclusão é que a citometria de fluxo é um teste inferior como ferramenta para diagnóstico de rotina devido a sua baixa sensibilidade, mas é recomendado quando linfoma maligno em efusões é suspeito.

A coincidência em ploidia de DNA entre locais de efusão e tumores primários foi examinado em 13 casos com efusões citologicamente positivas. Cinco dos 13 casos (38%) mostraram padrão de ploidia de DNA diferente entre os dois locais. É bem possível que houve poucas células malignas para suas aneuploidias em efusões serem detectadas em meio a muitas células não malignas, como leucócitos. Entretanto, Tsutsui et al.¹¹ especularam nos seus estudos sobre carcinoma de esôfago que a discordância poderia ser devido a

heterogeneidade intratumoral nas ploidias de DNA nos tumores primários. O conceito de heterogeneidade tumoral tem sido universalmente aceito, e nenhuma relação segura entre ploidia de DNA e prognóstico clínico é suspeito para este evento; alguns investigadores^{11,12,13} descreveram que o padrão de aneuploidia mostrou um pior prognóstico, e outros^{13,14} reportaram nenhuma correlação. A citometria de fluxo pode ser útil para detectar a heterogeneidade das células tumorais.

Em conclusão, a análise de DNA de células de efusões malignas não tem valor diagnóstico como teste de rotina, mas pode ter em casos de linfoma maligno. Mais casos com linfoma maligno serão requeridos para traçar uma conclusão definitiva

BIBLIOGRAFIA

1. Evans DA, Thornthwait JT, Sugarbaker EV. DNA flow cytometry of pleural effusions. Comparison with pathology for the diagnosis of malignancy. *Analyt Quant Cytol Histol* 5: 19-27, 1983.
2. Kapusta L, Zbieranowski, DemianiukC, Murray D. The role of DNA flow and image cytometry in the evaluation of body cavity fluids. *Analyt Quant Cytol Histol* 13:187-92, 1991.

3. Stonesifer KJ, Xiang J, Wilkinson EJ, Benson NA, Braylan RC. Flow cytometric analysis and cytopathology of body cavity fluids. *Acta Cytol* 31: 125-30, 1987.
4. Rijken A, Dekker A, Taylor S et al. Diagnostic value of DNA analysis in effusions by flow Cytometry and image analysis. A prospective study on 102 patients as compared with cytologic examination. *Am J Clin Pathol* 95: 6-12, 1991.
5. Vindelov LL, Christensen IJ, Keiding N, Spang-Thomsen M, Nissen NI. Long-term storage of samples for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 317-22, 1982.
6. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 323-7, 1983.
7. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31: 1333-5, 1983.
8. Elsheikh TM, Silverman JF, McCool JW, Riley RS. Comparative DNA analysis of solid tumors by flow cytometric and image analysis of touch imprints and flow cell suspensions. *Am J Clin Pathol* 98: 296-304, 1992.

9. Hedley DW, Philips J, Rugg CA, Taylor IW. Measurement of cellular DNA content as an adjunct to diagnostic cytology in malignant effusions. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20: 753-9, 1984.
10. Jones MA, Hitchcox S, D'Ascanio P, Papillo J, Tarraza HM. Flow Cytometric DNA analysis versus cytology in the evaluation of peritoneal fluids. *Gynecol Oncol* 43: 226-2, 1991.
11. Tsutsui S, Kuwano H, Mori M, Matsuura H, Sugimachi K. A flow cytometric analysis of DNA content in primary and metastatic lesions of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 70: 2586-91, 1992.
12. Backdahl M, Cohn K, Auer G et al. Comparison of nuclear DNA content in primary and metastatic papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 45: 2890-4, 1985.
13. Sasaki K, Murakami T. Clinical application of flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. *Acta Pathol Jpn* 42: 1-14, 1992.
14. Koss LG. ed. Diagnostic cytology and its histopathologic bases, 4th edn. Philadelphia: JB Lippincott, 1993, pp 1613.

Tabela 1

Doenças básicas em pacientes com efusões da cavidade corporal

Doenças básicas	Nº de casos
I - <u>Doenças não malignas</u> (n=33)	
Pleurite não maligna	11
Piotórax	10
Insuficiência cardíaca congestiva	08
Outras	04
II – <u>Doenças malignas</u> (n=71)	
Carcinomas gastrointestinal	39
Carcinomas torácicos	12
Malignidades hematopoiéticas	12
Carcinomas de cabeça e pescoço	04
Outras	04

Tabela 2

Citologia Convencional e análise de citometria de fluxo em cada fluido da cavidade corporal

Fluido da Cavidade Corporal	Citologia positiva	Citometria	de	Fluxo
		Aneuploidia	Diploidia	Duvidoso
I - Doenças não malignas				
Efusão pleural	0/31	0/31	29/31	02/31
Efusão peritoneal	0/02	0/02	02/02	00/02
Efusão pericárdica	<u>0/00</u>	<u>0/00</u>	<u>00/00</u>	<u>00/00</u>
	0/33 (0%)	0/33(0%)	31/33(94%)	02/33(6%)
II - Doenças malignas				
Efusão pleural	22/41(54%)	9/41(22%)	29/41	03/41
Efusão peritoneal	15/25(60%)	03/25(12%)	22/25	00/25
Efusão pericárdica	<u>01/05(25%)</u>	<u>01/05(25%)</u>	<u>04/05</u>	<u>00/05</u>
	38/71(45%)	13/71(18%)	55/71(78%)	03/71(4%)
	a,c	b		

a) $p < 0,001$ vs grupo de doenças não malignasb) $p < 0,01$ vs grupo de doenças não malignasc) $p < 0,001$ vs grupo de aneuploidia

Tabela 3

Positividade em citologia convencional e em citometria de fluxo

Citologia positiva	Aneuploidia	Porcentagens	
		Doenças não malignas	Doenças malignas
+	+	0	13%(09)
+	-	0	41%(29)
-	+	0	06%(04) a
-	-	<u>100 (33)</u>	<u>41% (29)</u>
		100(33)	100%(71)

a) Quatro amostras incluindo 1 carcinoma de células claras e 3 linfomas malignos.

Tabela 4

Comparação de positividade (%) entre citologia convencional e citometria de fluxo em cada órgão primário

Órgão primário	Citologia positiva (%)	Aneuplóide (%)
I - <i>Tipo epitelial de malignidade</i>	51% (30/59)	12% (7/59)
Câncer de estômago	58% (07/12)	17% (2/12)
Câncer de pulmão	82% (09/11)	36% (4/11)
Câncer de pâncreas	70% (07/10)	00% (0/10)
Câncer de fígado e canal biliar	00% (00/07)	00% (0/07)
Câncer de esôfago	17% (01/06)	00% (0/06)
Câncer de colon	75% (03/04)	00% (0/04)
Câncer de cabeça e pescoço	75% (03/04)	00% (0/04)
Outros	60% (03/05)	20% (6/12)
II – <i>Malignidade hematopoiética</i>	42% (05/12)	50% (6/12)^a

a) $p < 0.001$ vs grupo de tipo epitelial

Tabela 5

Comparação de positividade entre citologia convencional e citometria de fluxo em cada tipo histológico de malignidade

Tipo Histológico	Citologia positiva (%)	Aneuploidia
Adenocarcinoma	63% (27/43)	14% (6/43)
Carcinoma de células escamosas	31% (04/13)	00% (0/13)
Outros tipos epiteliais	67% (02/03)	33% (1/03)
Linfoma maligno	40% (04/10)	60% (6/10)
Outros tipos hematopoiético	50% (01/02)	00% (0/02)

Tabela 6

Ploidia de DNA entre local de efusão e local primário em 13 casos com citologia de efusão positiva

Casos (Nº)	Órgão Primário	Ploidia de DNA efusão	Ploidia de DNA primário
01	Cavidade nasal (ad)	Diplóide	Diplóide
02	Estômago (ad)	Diplóide	Diplóide
03	Pâncreas (desclassificado)	Diplóide	Diplóide
04	Vesícula biliar (ad)	Diplóide	Diplóide
05	Ln cervical (linfoma)	Diplóide	Diplóide
06	Timoma maligno (tipo epitelial)	Diplóide	Diplóide
07	Ln. Mediastínico (linfoma)	Aneuplóide	Aneuplóide
08	Ln. Abdominal (linfoma)	Aneuplóide	Aneuplóide
09	Estômago	Aneuplóide	Diplóide
10	Mama (ca. de ducto)	Diplóide	Aneuplóide
11	Pâncreas (ad)	Diplóide	Aneuplóide
12	Pâncreas (ad)	Diplóide	Aneuplóide
13	Estômago (ad)	Diplóide	Aneuplóide

LEGENDA DA FIGURA

Figura 1: Histogramas de DNA de efusões e tumores primários dos casos 2, 9 e 13, de acordo com a tabela 6.

