

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDO COMPARATIVO DE DUAS TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA A  
DETECÇÃO DO HLA-B27 EM PACIENTES PORTADORES DE ESPONDILOARTRITE  
AXIAL

RICARDO DOS SANTOS ANGELI

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDO COMPARATIVO DE DUAS TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA A  
DETECÇÃO DO HLA-B27 EM PACIENTES PORTADORES DE ESPONDILOARTRITE  
AXIAL

RICARDO DOS SANTOS ANGELI

Orientador: Prof. Dr. Odirlei André Monticielo  
Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção de título de Mestre em  
Medicina: Ciências Médicas, da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, Programa de  
Pós Graduação em Medicina: Ciências  
Médicas.

Porto Alegre

2017

**BANCA EXAMINADORA**

Ana Paula Alegretti

Penélope Esther Palominos

Claiton Viegas Brenol

Rafael Mendonça da Silva Chakr

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aglaé Salete dos Santos Angeli e Nilvo José Angeli pelo exemplo e ensinamentos diários. Sábias pessoas que educam pelo exemplo sem temerem as dificuldades. Obrigado pelo incentivo em sempre buscar o aprimoramento pessoal e profissional.

Aos meus irmãos, Karen e Gustavo dos Santos Angeli, meus melhores amigos e com quem sempre posso contar sem nunca me deixarem à mercê das dificuldades.

À namorada, minha linda Camilla Regina de Souza Madeira, pessoa que abrilhanta minha existência e que me dá o exemplo ao me ensinar com destreza e objetividade, sempre me apoiando mesmo nos momentos mais difíceis. Empatia e amor incondicionais que só me impulsionaram para concluir essa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Odirlei André Monticielo pela confiança e por compartilhar do seu tempo e conhecimento. Demonstrou sempre estar presente e, com paciência, apontou o caminho a ser seguido. Ao meu coorientador, Prof. Charles Lubianca Kohem, pelo aceite ao ingressar no projeto, perspicácia e dedicação diário com que atua como médico e professor.

À Dra. Ana Paula Alegretti por me apresentar o projeto e os professores Odirlei e Charles, parceiros dessa caminhada. À Dra. Penélope Esther Palominos, que me acolheu e me ensinou como dar andamento ao nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier, pelo incentivo pela manutenção do trabalho e sapiência, sempre sugerindo alternativas adequadas às nossas dificuldades.

À equipe do laboratório de biologia molecular do HCPA, e do laboratório Zanol Ltda, pela parceria na realização dos exames dos nossos pacientes.

Aos colegas que atuaram nesse estudo pelo companheirismo e pela convivência fraterna capazes de transformar as experiências diárias em fonte de contínuo aprendizado. Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por me propiciar um ambiente de trabalho favorável ao aprimoramento profissional e crescimento intelectual. Aos pacientes que fizeram parte dessa pesquisa, por sua dedicação despretensiosa e voluntária a causa científica e por nos inspirarem diariamente a seguir em frente. A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente na conclusão desse trabalho.

“DAS UTOPIAS

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!”

Mário Quintana

## RESUMO

**Introdução:** A Espondiloartrite axial (EpA-ax) é uma doença inflamatória e crônica do grupo das Espondiloartrites (EpA). Ela acomete o sistema músculo esquelético ocasionando inflamação das articulações axiais (especialmente da sacroilíaca). Quando essas manifestações são evidenciadas por exames de imagem, temos a caracterização da Espondilite Anquilosante (EA). Do contrário, chamamos de EpA-axial não radiográfica (EpA-ax-nr). A Espondilite Anquilosante (EA) se caracteriza pelo envolvimento inflamatório de articulações do esqueleto axial e apendicular. Seu diagnóstico é baseado em achados clínicos e radiológicos, além da elevação de marcadores inflamatórios e presença do HLA-B27. Várias são as metodologias que se propõem a identificar o HLA-B27 e a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é tida como referência. Sua ampla utilização esbarra, no entanto, em questões que levam em conta o custo, oferta do exame e o tempo até a obtenção do resultado. Neste contexto, a Citometria de Fluxo (CF) surge como uma alternativa capaz de ajudar o médico na identificação deste marcador genético que pode ser importante para o diagnóstico e prognóstico dessa doença.

**Objetivo:** Avaliar a correlação entre as técnicas laboratoriais mais utilizadas na prática clínica (CF e PCR), comparando sensibilidade e especificidade para detecção do HLA-B27 em pacientes com diagnóstico estabelecido de EpA-ax.

**Métodos:** Estudo transversal, comparativo, com pacientes maiores de 18 anos de idade selecionados por conveniência, coletados ao longo de 2015, com diagnóstico estabelecido de EpA-ax, segundo os do grupo internacional ASAS (*working group - Assessment of SpondyloArthritis International Society*). Para a análise estatística o coeficiente Kappa ( $P < 0,005$ ) foi adotado como parâmetro. O teste Exato de Fisher foi utilizado para comparar as variáveis categóricas, o teste t de Student, para variáveis quantitativas com distribuição

simétrica de amostras independentes. E as variáveis com distribuição assimétrica foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney.

**Resultados:** O coeficiente Kappa obtido para a determinação da concordância entre os testes foi de 0,454. Foram incluídos no estudo 62 pacientes, desses, sessenta preencheram os critérios para diagnóstico de EA e 2 para EpA-ax não radiográfica (EpA-ax-nr), 64,5% dos pacientes eram do sexo masculino, 88,7% se autodeclararam brancos, a idade média ( $\pm$  desvio padrão) foi de  $54,5 \pm 12$  anos e o tempo mediano (percentis 25 e 75) de diagnóstico de 14 (9 e 24) anos. Dentre as características clínicas apresentadas pela população estudada houve diferença estatisticamente significativa para a artrite periférica, sendo mais frequente no grupo HLA-B27 negativo que no grupo HLA-B27 positivo ( $P=0,032$ ). Na análise de correlação, 90,3% apresentaram tipagem HLA-B27 positiva por CF e 79,0% pela técnica de PCR. Tendo o PCR como padrão ouro, a CF apresentou uma sensibilidade de 98,0%, especificidade de 38,5% e uma acurácia de 85,5%.

**Conclusão:** Apesar da baixa especificidade apresentada pela CF, nosso estudo demonstrou que a CF tem alta sensibilidade e boa acurácia o que a torna uma boa alternativa para ser utilizada como um teste de triagem na busca da caracterização da doença. Apesar da moderada concordância com a técnica de referência, a CF poderia ajudar o médico a excluir resultados falsamente negativos, racionalizando assim a investigação laboratorial para o diagnóstico da EA.

**Palavras chave:** Espondiloartrites (EpA), Espondiloartrite axial (EpA-ax), Espondilite Anquilosante (EA), HLA-B27, Citometria de Fluxo (CF), *Polymerase Chain Reaction* (PCR).



## ABSTRACT

**Introduction:** Axial spondyloarthritis (SpA-ax) is an inflammatory and chronic disease of the Spondyloarthritis (SpA) group. It affects the skeletal muscle system causing inflammation of the axial joints (especially of the sacroiliac). When these manifestations are evidenced by imaging tests, a characterization of Ankylosing Spondylitis (AS). Otherwise, we call the non-radiographic SpA-axial (SpA-ax-nr). AS marked by the inflammatory involvement of the axial and appendicular skeletal joints. The diagnosis is based on clinical and radiological findings, as well as the on the elevation of inflammatory markers and presence of HLA-B27. There are several methodologies to identify the HLA-B27 gene and a Polymerase Chain Reaction (PCR) is considered the reference method. However, its use on a large scale does not progress because it takes into account the cost, offer of the exam and the running time to obtain the result. In this context, Flow Cytometry (FC) emerges as an alternative method, helping with the physician in the determination of this genetic marker, important for the diagnosis and prognosis of disease.

**Objective:** To evaluate the correlation between FC and PCR, comparing sensitivity and specificity for detection of HLA-B27 in patients with established diagnosis of SpA-ax.

**Methods:** A cross sectional study including 62 patients recruited during 2015 month was conducted in Hospital de Clínicas de Porto Alegre, an university public hospital. The sample, recruited by convenience in the SpA clinic, was composed of patients  $\geq 18$  years old, fulfilling the Assessment of Spondyloarthritis (ASAS) criteria SpA-ax. All participants underwent HLA-B27 typing through FC and PCR. The kappa statistic was used to calculate the concordance between the FC and PCR. Taking PCR as the gold standard, sensitivity and specificity of FC to detect HLA-B27 were calculated.

**Results:** The Kappa coefficient obtained to determine the agreement between the tests was 0.454. Sixty two patients were included in the study, sixty met the criteria for diagnosis of AS and two for SpA-ax-nr, 64.5% of the patients were male, 88.7% were self-declared mean age ( $\pm$  standard deviation) was  $54.5 \pm 12$  years and median time (25th and 75th percentiles) for diagnosis was 14 (9 and 24) years. Among the clinical characteristics presented by the population studied, there was a statistically significant difference for peripheral arthritis, which was more frequent in the HLA-B27 negative group than in the HLA-B27 positive group ( $P = 0.032$ ). In the correlation analysis, 90.3% presented HLA-B27 positive typing by FC and 79.0% by PCR technique. When PCR was considered the gold standard, FC had a sensitivity of 98.0%, specificity of 38.5% and an accuracy of 85.5%.

**Conclusion:** Despite the low specificity presented by FC, our study demonstrated that FC has high sensitivity and good accuracy, which makes it a good alternative to be used as a screening test in the search for the characterization of the disease. Despite the moderate agreement with the reference technique, FC could help the physician to exclude falsely negative results, thus rationalizing laboratory investigation for the diagnosis of AS.

**Key words:** Spondyloarthritis (SpA), Axial Spondyloarthritis (axSpA), Ankylosing Spondylitis (AS), HLA-B27, Flow Cytometry (FC), Polymerase Chain Reaction (PCR).



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Etapas do processo de pesquisa de trabalhos científicos. ....	16
<b>Figura 2:</b> Resultados quantitativos da busca literária nas bases de dados. ....	25
<b>Figura 3:</b> Radiografia convencional e ressonância nuclear magnética da articulação sacroilíaca da região pélvica de dois pacientes com Espondiloartrite axial. ....	26
<b>Figura 4:</b> “Coluna de bambu”, manifestação clássica em estágio avançado da doença. ....	27
<b>Figura 5:</b> Fatores envolvidos na fisiopatogenia da Espondilite Anquilosante. ....	30
<b>Figura 6:</b> Esquema do processo de funcionamento do citômetro de fluxo. ....	36

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

<b>Figura 1 :</b> Gráficos de expressão do marcador por Citometria de Fluxo. ....	61
<b>Figura 2 :</b> Gel de agarose com brometo de etídeo revelado pós corrida eletroforética. ....	61
<b>Figura 3 :</b> Fluxograma de recrutamento e inclusão de participantes no estudo. ....	62

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

<b>Tabela 1:</b> Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população estudada de acordo com a presença de antígeno HLA-B27 por PCR.....	63
<b>Tabela 2:</b> Comparação entre os resultados do HLA-B27 das técnicas em <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) e Citometria de Fluxo (CF) .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASAS	Assessment of SpondyloArthritis Intenational Society (Avaliação da Sociedade Internacional de Espondiloartrites)
CF	Citometria de Fluxo
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DeCS	Descritores em Ciências da Saúde
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos livres
EA	Espondilite Anquilosante
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido Etileodiamina Tetraacético)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunossorvente ligado a enzimas)
EpA	Espondiloartrites
EpA-ax	Espondiloartrite axial
EpA-ax-nr	Espondiloartrite axial não-radiográfica
EpA-i	Espondiloartrite indiferenciada
EpA-j	Espondiloartrite juvenil
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de Fluoresceína)
FR	Fator Reumatoide
HLA-B27	Human Leukocyte Antigen B27 (Antígeno Leucocitário Humano-B27)
Mb	Megabases
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo Maior de Histocompatibilidade)
pb	Pares de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação da Cadeia da Polymerase)
PCR-SSP	Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers (Reação da Cadeia da Polymerase – Iniciadores de Sequencia Específica)
PE	Phycoerythrin (Ficoeritrina)
TA	Tubo Aberto
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Fator alfa (Fator de Necrose Tumoral alfa)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .....	15
2.1.1 PUBMED.....	16
2.1.2 SCOPUS .....	18
2.1.3 WEB OF SCIENCE .....	22
2.1.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	23
2.1.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	24
2.1.6 RESULTADOS DA BUSCA.....	24
2.2 ESPONDILOARTRITES COM ENVOLVIMENTO AXIAL.....	25
2.2.1 ESPONDILITE ANQUILOSANTE (EA).....	27
2.2.1.1 DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E SINTOMAS DA EA .....	28
2.2.1.2 EPIDEMIOLOGIA DA EA .....	28
2.2.1.3 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA EA .....	29
2.3 HLA-B27 .....	31
2.3.1 METODOLOGIAS DISPONÍVEIS PARA TRIAGEM DO HLA-B27 .....	33
2.3.1.1 REAÇÃO DA CADEIA DA POLYMERASE (PCR).....	33
2.3.1.2 CITOMETRIA DE FLUXO (CF) .....	34
3 MARCO TEÓRICO .....	37
4 JUSTIFICATIVA .....	38
5 OBJETIVOS.....	39
5.1. OBJETIVO PRIMÁRIO.....	39
5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	39
6 REFERÊNCIAS .....	40
7 ARTIGO.....	48

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	70
9 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	71
10 ANEXOS .....	72
ANEXO I. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	72
ANEXO II. TERMO DE CONFIDENCIALIDADE PARA USO DE DADOS .....	74
ANEXO III. CARTA DE APROVAÇÃO DO ESTUDO PELA COMISSÃO CIENTÍFICA. ....	75
ANEXO IV. DECLARAÇÃO STARD.....	76



## 1 INTRODUÇÃO

As Espondiloartrites (EpA) englobam um conjunto de doenças inflamatórias que acometem o sistema musculoesquelético que inclui: Espondilite Anquilosante (EA), EpA-axial não-radiográfica (EpA-ax-nr), EpA indiferenciada (EpA-i), artrite reativa, artrite psoriática, EpA Juvenil (EpA-j) e artrites associadas com inflamação intestinal, incluindo a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa (1). Em 2009, o grupo de estudos internacional ASAS (*Assessment of SpondyloArthritis Intenational Society*), formado por médicos, pesquisadores, pacientes e representantes da indústria farmacêutica com experiências em EA, envolvendo mais de 20 países, classificou as EpA amplamente em dois grupos, podendo ser diferenciadas como axial e periférica, de acordo com o sítio musculoesquelético atingido (1-3).

O termo EpA abrange tanto a fase inflamatória inicial da doença em que não há dano estrutural nas articulações sacroilíacas (doença não-radiográfica) quanto os estágios posteriores em que o dano estrutural é visível nas varreduras de raio-X das articulações sacroilíacas como erosões, esclerose ou pontes ósseas (3, 4).

A EA é uma doença inflamatória crônica e prototípica do grupo das EpA que acomete preferencialmente a coluna vertebral. Ela é uma doença insidiosa e potencialmente debilitante que leva à redução na qualidade de vida dos indivíduos acometidos (5). A prevalência estimada é de 0,1 a 1,4% da população em geral, sendo a maioria destes dados provenientes da Europa e a incidência varia entre 0,5 e 14 casos novos para cada 100.000 pessoas por ano (5-8). A EA geralmente afeta adultos jovens com idade média de 26 anos, sendo que cerca de 80% desenvolvem os primeiros sintomas antes dos 30 anos e menos de 5% após os 45 anos. Esta patologia acomete homens com maior frequência em uma proporção de 2:1 (9).

No Brasil, cerca de 70% das EpA são EA, com um custo anual médio para a sociedade estimado em US\$ 4.597,00 por paciente (10). Além do custo social, a EA acarreta piora da qualidade de vida para o paciente, está associada a um risco aumentado de doença cardiovascular aterosclerótica, impactando de forma negativa diversos domínios da vida pessoal, inclusive a atividade sexual (11-13). A identificação da doença em seu estágio inicial e o encaminhamento ágil e adequado para o atendimento especializado dão à atenção básica um caráter essencial para um melhor resultado terapêutico e prognóstico dos casos (14).

Diante disso, a identificação precoce da doença é essencial para a manutenção da qualidade de vida do paciente e um melhor resultado terapêutico e prognóstico. A EA é definida pelos achados clínicos e radiológicos e o *Human Leukocyte Antigen-B27* (HLA-B27) é reconhecido por ter uma estreita relação com essa patologia (15).

As causas da EA e de outras EpA ainda são desconhecidas mas sabe-se que sofrem uma forte influência genética, especialmente a EA, pois entre os pacientes portadores de EA, 90 a 95% apresentam soropositividade para o HLA-B27 (15, 16). Por sua grande positividade na EA, a determinação do HLA-B27 acaba sendo uma ferramenta bastante útil na construção do diagnóstico (17).

Dessa forma, a genotipagem do HLA-B27 é um ponto fundamental no diagnóstico sendo a citometria de fluxo (CF) e a amplificação do DNA por reação em cadeia da Polymerase, no idioma inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR) as técnicas laboratoriais mais utilizadas. Não há um consenso na literatura sobre qual a melhor técnica e em associação com a prática clínica tem se observado resultados discrepantes. Existem poucos estudos comparando diretamente estas duas metodologias na pesquisa pelo marcador genético e não há nenhum estudo em amostra da população brasileira (18-21).

Ainda para fins diagnósticos, a literatura traz trabalhos que abordam metodologias fundamentadas em questionários, técnicas de investigação sorológicas, como a

Microinfotoxicidade e o ensaio de imuno absorção ligado à enzima, do idioma inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para a determinação do marcador genético. Marcadores laboratoriais como, presença de Fator Reumatoide (FR), Proteína C Reativa e quantificação de interleucinas e interferon gama relacionam-se com o andamento da doença (22, 23).

Nesse sentido, o desenvolvimento deste trabalho busca avaliar a concordância das duas técnicas laboratoriais mais utilizadas na prática clínica (CF e PCR), comparando sensibilidade e especificidade para detecção do HLA-B27 em pacientes com diagnóstico estabelecido de EpA-ax.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

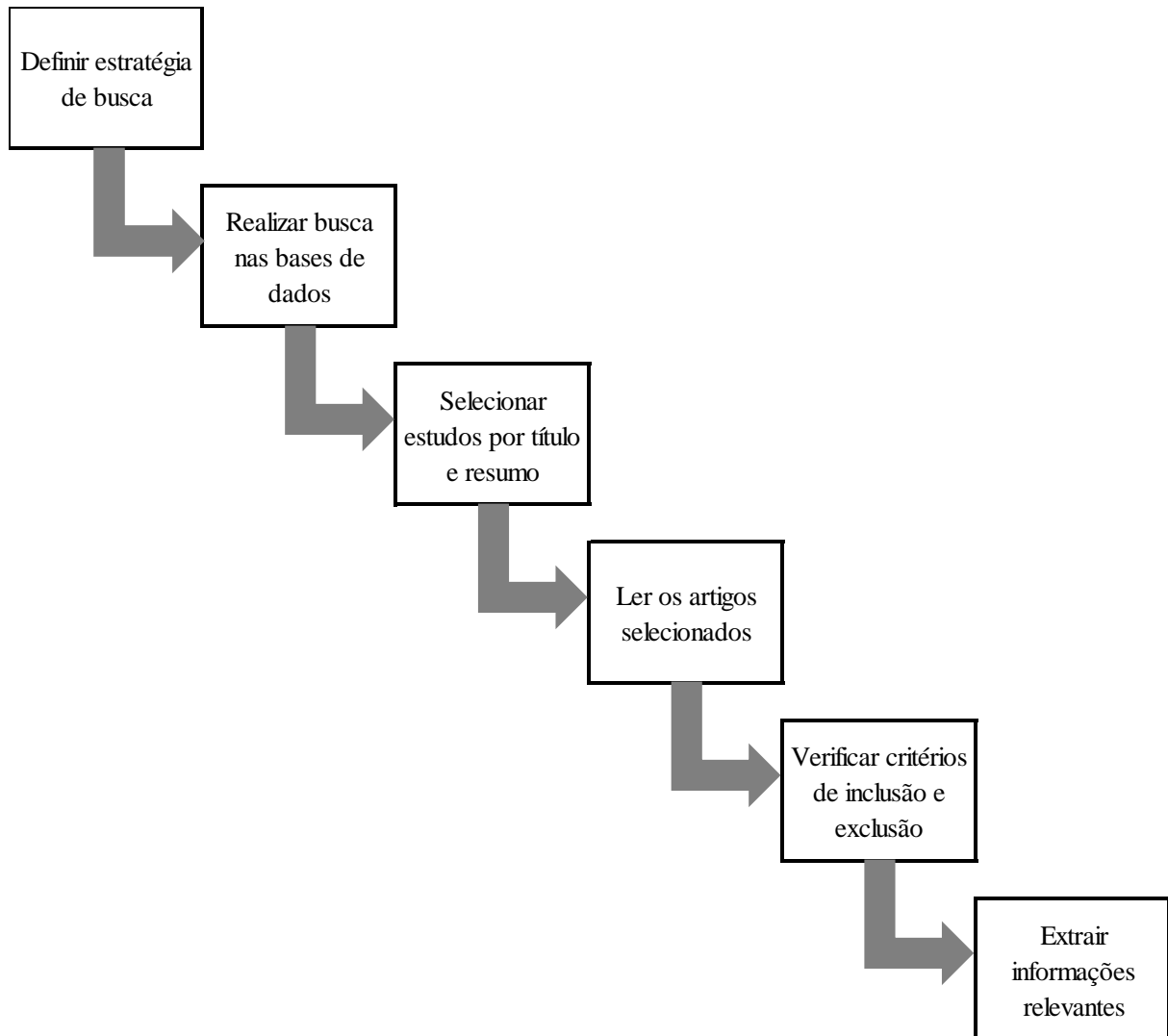
### **2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações**

A estratégia de busca utilizada envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE via PubMed, Scopus e Web of Science. Foi complementada através de busca manual por registros não indexados ou contato com autores. Nessa atividade foram utilizados os seguintes descritores Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): “Flow Cytometry”, “Protein Chain Reaction”, “HLA-B27” e “Ankylosing Spondylitis”.

O trabalho contou com a utilização dos descritores booleanos “and” e “or” onde dois revisores independentes trabalharam selecionando artigos científicos baseados no título e resumo Title/Abstract e compararam os resultados das suas pesquisas entre si. Havendo discordância de resultados, um terceiro revisor era consultado. Todos os artigos selecionados foram lidos integralmente e, dos estudos incluídos após a leitura, foi realizada extração de dados sobre a etiologia da EA, sua epidemiologia, características clínicas da doença, tratamento dos sintomas e critérios para avaliação diagnóstica.

A figura 1 apresenta um esquema resumido das etapas do processo de busca de trabalhos que foi realizada:

**Figura 1:** Etapas do processo de pesquisa de trabalhos científicos.



Os seguintes termos e seus descritores correlacionados foram utilizados na estratégia de busca:

### 2.1.1 Pubmed

#### a) Descritores DeCS para “Flow Cytometry”:

("flow microfluorometric"[Title/Abstract] OR "flow microfluorometrics"[Title/Abstract] OR "flow cytofluorometric"[Title/Abstract] OR "flow cytofluorometrics"[Title/Abstract] OR "flow cytometric"[Title/Abstract] OR "flow cytometrics"[Title/Abstract] OR "Flow Microfluorometries"[Title/Abstract])

OR "Flow Microfluorometry"[Title/Abstract] OR "Flow Microfluorimetry"[Title/Abstract] OR "Flow Cytofluorometries"[Title/Abstract] OR "Flow Cytofluorometry"[Title/Abstract] OR "Flow Cytometries"[Title/Abstract] OR "fluorescence-activated cell sorting"[Title/Abstract] OR "fluorescence activated cell sorting"[Title/Abstract] OR "fluorescence activated cell sorting"[Title/Abstract] OR "cell separation"[Title/Abstract] OR "cytological techniques"[Title/Abstract] OR "cytological technique"[Title/Abstract] OR Immunotyp\*[Title/Abstract] OR "Immunologic Subtyping"[Title/Abstract] OR "Immunological Subtyping"[Title/Abstract] OR "Immunologic Subtypings"[Title/Abstract] OR "Immunological Subtypings"[Title/Abstract] OR "Immunologic Subtype"[Title/Abstract] OR "Immunological Subtype"[Title/Abstract] OR "Immunologic Subtypes"[Title/Abstract] OR "Immunological Subtypes"[Title/Abstract] OR "Lymphocyte Subtyping"[Title/Abstract] OR "Lymphocyte Subtypings"[Title/Abstract] OR "Lymphocyte Subtype"[Title/Abstract] OR "Lymphocyte Subtypes"[Title/Abstract] OR "Lymphocyte Phenotyping"[Title/Abstract] OR "Lymphocyte Phenotypings"[Title/Abstract] OR "Lymphocyte Phenotype"[Title/Abstract] OR "Lymphocyte Phenotypes"[Title/Abstract] OR Cytophotometr\*[Title/Abstract] OR "flow cytometry"[MeSH Terms])

b) Descriptores DeCS para "Protein Chain Reaction":

("Polymerase Chain Reaction"[Mesh:NoExp] OR PCR[Title/Abstract] OR "polymerase chain reaction"[Title/Abstract] OR "polymerase chain reactions"[Title/Abstract])

c) Descriptores DeCS para "HLA-B27":

(HLAB27[Title/Abstract] OR "HLA B 27"[Title/Abstract] OR "HLA B-27"[Title/Abstract] OR "HLA-B27"[Title/Abstract] OR "Human Leucocyte Antigens B27"[Title/Abstract] OR "HLA-B27 Antigen"[Mesh])

d) Descriptores DeCS para "AnkylosingSpondylitis":

("Spondyloarthritis Ankylopoietica"[Title/Abstract] OR "Ankylosing  
 Spondylarthritis"[Title/Abstract] OR "Ankylosing  
 Spondylarthritis"[Title/Abstract] OR "Ankylosing Spondylitis"[Title/Abstract] OR  
 "Spondyloarthritis Ankylopoietica"[Title/Abstract] OR "Bechterew  
 Disease"[Title/Abstract] OR "Bechterew's Disease"[Title/Abstract] OR "Bechterew's  
 Disease"[Title/Abstract] OR "Marie-Struempell Disease"[Title/Abstract] OR "Marie  
 Struempell Disease"[Title/Abstract] OR "Rheumatoid Spondylitis"[Title/Abstract]  
 OR "Spondylitis Ankylopoietica"[Title/Abstract] OR "Ankylosing  
 Spondyloarthritis"[Title/Abstract] OR "Ankylosing  
 Spondyloarthritis"[Title/Abstract] OR spondyl\*[Title/Abstract] OR  
 backpain\*[Title/Abstract] OR "back pain"[Title/Abstract] OR  
 enthesitis[Title/Abstract] OR Enthesopath\*[Title/Abstract] OR  
 sacroiliit\*[Title/Abstract] OR uveitis[Title/Abstract] OR dactylitis[Title/Abstract]  
 OR "spondylitis, ankylosing"[MeSH Terms] OR "Spondylarthropathies"[Mesh] OR  
 "Back Pain"[Mesh:NoExp] OR "Enthesopathy"[Mesh] OR "Sacroiliitis"[Mesh] OR  
 "Uveitis"[Mesh:NoExp] OR ("Finger Joint/pathology"[MeSH] AND  
 Inflammation[MeSH]))

Resultado Pubmed para: a AND b AND c AND d

16 REFERÊNCIAS PubMed

### 2.1.2 Scopus

#### a) Descritores DeCS para "Flow Cytometry":

(TITLE-ABS-KEY("flow microfluorometric") OR TITLE-ABS-KEY("flow  
 microfluorometrics") OR TITLE-ABS-KEY("flow cytofluorometric") OR TITLE-  
 ABS-KEY("flow cytofluorometrics") OR TITLE-ABS-KEY("flow cytometric") OR  
 TITLE-ABS-KEY("flow cytometrics") OR TITLE-ABS-KEY("Flow  
 Microfluorometries") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Microfluorometry") OR TITLE-

ABS-KEY("Flow Microfluorimetry") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Cytofluorometries") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Cytofluorometry") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Cytometries") OR TITLE-ABS-KEY("fluorescence-activated cell sorting") OR TITLE-ABS-KEY("fluorescence activated cell sorting") OR TITLE-ABS-KEY("fluorescence activated cell sorting") OR TITLE-ABS-KEY("cell separation") OR TITLE-ABS-KEY("cytological techniques") OR TITLE-ABS-KEY("cytological technique") OR TITLE-ABS-KEY(Immunotyp\*) OR TITLE-ABS-KEY("Immunologic Subtyping") OR TITLE-ABS-KEY("Immunological Subtyping") OR TITLE-ABS-KEY("Immunologic Subtypings") OR TITLE-ABS-KEY("Immunological Subtypings") OR TITLE-ABS-KEY("Immunologic Subtype") OR TITLE-ABS-KEY("Immunological Subtype") OR TITLE-ABS-KEY("Immunologic Subtypes") OR TITLE-ABS-KEY("Immunological Subtypes") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Subtyping") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Subtypings") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Subtype") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Subtypes") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Phenotyping") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Phenotypings") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Phenotype") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Phenotypes") OR TITLE-ABS-KEY(Cytophotometr\*) OR TITLE-ABS-KEY("flow cytometry"))

b) Descriptores DeCS para "Protein Chain Reaction":

(TITLE-ABS-KEY("Polymerase Chain Reaction") OR TITLE-ABS-KEY(PCR) OR TITLE-ABS-KEY("polymerase chain reaction") OR TITLE-ABS-KEY("polymerase chain reactions"))

c) Descriptores DeCS para "HLA-B27":

(TITLE-ABS-KEY(HLAB27) OR TITLE-ABS-KEY("HLA B 27") OR TITLE-ABS-KEY("HLA B-27") OR TITLE-ABS-KEY("HLA-B27") OR TITLE-ABS-KEY("Human Leucocyte Antigens B27") OR TITLE-ABS-KEY("HLA-B27 Antigen"))



d) Descriptores DeCS para “AnkylosingSpondylitis”:

(TITLE-ABS-KEY("Spondyloarthritis Ankylopoietica") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondylarthritis") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondylarthritides") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondylitis") OR TITLE-ABS-KEY("Spondylarthritis Ankylopoietica") OR TITLE-ABS-KEY("Bechterew Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Bechterew's Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Bechterews Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Marie-Struempell Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Marie Struempell Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Rheumatoid Spondylitis") OR TITLE-ABS-KEY("Spondylitis Ankylopoietica") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondyloarthritis") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondyloarthritides") OR TITLE-ABS-KEY(spondyl\*) OR TITLE-ABS-KEY(backpain\*) OR TITLE-ABS-KEY("back pain") OR TITLE-ABS-KEY(enthesis) OR TITLE-ABS-KEY(Enthesopath\*) OR TITLE-ABS-KEY(sacroiliit\*) OR TITLE-ABS-KEY(uveitis) OR TITLE-ABS-KEY(dactylitis) OR TITLE-ABS-KEY("spondylitis, ankylosing") OR TITLE-ABS-KEY("Spondylarthropathies"))

Resultado Scopus para:

((TITLE-ABS-KEY("flow microfluorometric") OR TITLE-ABS-KEY("flow microfluorometrics") OR TITLE-ABS-KEY("flow cytofluorometric") OR TITLE-ABS-KEY("flow cytofluorometrics") OR TITLE-ABS-KEY("flow cytometric") OR TITLE-ABS-KEY("flow cytometrics") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Microfluorometries") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Microfluorometry") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Microfluorimetry") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Cytofluorometries") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Cytofluorometry") OR TITLE-ABS-KEY("Flow Cytometries") OR TITLE-ABS-KEY("fluorescence-activated cell sorting") OR TITLE-ABS-KEY("fluorescence activated cell sorting") OR TITLE-ABS-KEY("fluorescence activated cell sorting") OR TITLE-ABS-KEY("cell separation") OR TITLE-ABS-KEY("cytological techniques") OR TITLE-ABS-

KEY("cytological technique") OR TITLE-ABS-KEY(Immunotyp\*) OR TITLE-ABS-KEY("Immunologic Subtyping") OR TITLE-ABS-KEY("Immunological Subtyping") OR TITLE-ABS-KEY("Immunologic Subtypings") OR TITLE-ABS-KEY("Immunological Subtypings") OR TITLE-ABS-KEY("Immunologic Subtype") OR TITLE-ABS-KEY("Immunological Subtype") OR TITLE-ABS-KEY("Immunologic Subtypes") OR TITLE-ABS-KEY("Immunological Subtypes") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Subtyping") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Subtypings") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Subtype") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Subtypes") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Phenotyping") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Phenotypings") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Phenotype") OR TITLE-ABS-KEY("Lymphocyte Phenotypes") OR TITLE-ABS-KEY(Cytophotometr\*) OR TITLE-ABS-KEY("flow cytometry")) AND (TITLE-ABS-KEY("Polymerase Chain Reaction") OR TITLE-ABS-KEY(PCR) OR TITLE-ABS-KEY("polymerase chain reaction") OR TITLE-ABS-KEY("polymerase chain reactions")) AND (TITLE-ABS-KEY(HLAB27) OR TITLE-ABS-KEY("HLA B 27") OR TITLE-ABS-KEY("HLA B-27") OR TITLE-ABS-KEY("HLA-B27") OR TITLE-ABS-KEY("Human Leucocyte Antigens B27") OR TITLE-ABS-KEY("HLA-B27 Antigen")) AND (TITLE-ABS-KEY("Spondyloarthritis Ankylopoietica") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondylarthritis") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondylarthritis") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondylitides") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondylitis") OR TITLE-ABS-KEY("Spondylarthritis Ankylopoietica") OR TITLE-ABS-KEY("Bechterew Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Bechterew's Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Bechterews Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Marie-Struempell Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Marie Struempell Disease") OR TITLE-ABS-KEY("Rheumatoid Spondylitis") OR TITLE-ABS-KEY("Spondylitis Ankylopoietica") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondyloarthritis") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondyloarthritis") OR TITLE-ABS-KEY("Ankylosing Spondylarthritis") OR TITLE-ABS-

KEY(spondyl\*) OR TITLE-ABS-KEY(backpain\*) OR TITLE-ABS-KEY("back pain") OR TITLE-ABS-KEY(enthesis) OR TITLE-ABS-KEY(Enthesopath\*) OR TITLE-ABS-KEY(sacroiliit\*) OR TITLE-ABS-KEY(uveitis) OR TITLE-ABS-KEY(dactylitis) OR TITLE-ABS-KEY("spondylitis, ankylosing") OR TITLE-ABS-KEY("Spondylarthropathies"))

51 REFERÊNCIAS Scopus

### 2.1.3 Web of Science

#### a) Descritores DeCS para “Flow Cytometry”:

(TS=("flow microfluorometric") OR TS=("flow microfluorometrics") OR TS=("flow cytofluorometric") OR TS=("flow cytofluorometrics") OR TS=("flow cytometric") OR TS=("flow cytometrics") OR TS=("Flow Microfluorometries") OR TS=("Flow Microfluorometry") OR TS=("Flow Microfluorimetry") OR TS=("Flow Cytofluorometries") OR TS=("Flow Cytofluorometry") OR TS=("Flow Cytometries") OR TS=("fluorescence-activated cell sorting") OR TS=("fluorescence activated cell sorting") OR TS=("cell separation") OR TS=("cytological techniques") OR TS=("cytological technique") OR TS=(Immunotyp\*) OR TS=("Immunologic Subtyping") OR TS=("Immunological Subtyping") OR TS=("Immunologic Subtypings") OR TS=("Immunological Subtypings") OR TS=("Immunologic Subtype") OR TS=("Immunological Subtype") OR TS=("Immunologic Subtypes") OR TS=("Immunological Subtypes") OR TS=("Lymphocyte Subtyping") OR TS=("Lymphocyte Subtypings") OR TS=("Lymphocyte Subtype") OR TS=("Lymphocyte Subtypes") OR TS=("Lymphocyte Phenotyping") OR TS=("Lymphocyte Phenotypings") OR TS=("Lymphocyte Phenotype") OR TS=("Lymphocyte Phenotypes") OR TS=(Cytophotometr\*) OR TS=("flow cytometry"))

b) Descritores DeCS para “Protein Chain Reaction”:

(TS=("Polymerase Chain Reaction") OR TS=(PCR) OR TS=("polymerase chain reaction") OR TS=("polymerase chain reactions"))

c) Descritores DeCS para “HLA-B27”:

(TS=(HLAB27) OR TS=(“HLA B 27”) OR TS=(“HLA B-27”) OR TS=(“HLA-B27”) OR TS=( “Human Leucocyte Antigens B27”) OR TS=(“HLA-B27 Antigen”))

d) Descritores DeCS para “AnkylosingSpondylitis”:

(TS=("Spondyloarthritis Ankylopoietica") OR TS=("Ankylosing Spondylarthritis") OR TS=("Ankylosing Spondylarthritis") OR TS=("Ankylosing Spondylitis") OR TS=("Spondylarthritis Ankylopoietica") OR TS=("Bechterew Disease") OR TS=("Bechterew's Disease") OR TS=("Bechterews Disease") OR TS=("Marie-Struempell Disease") OR TS=("Marie Struempell Disease") OR TS=("Rheumatoid Spondylitis") OR TS=("Spondylitis Ankylopoietica") OR TS=("Ankylosing Spondyloarthritis") OR TS=("Ankylosing Spondyloarthritis") OR TS=(spondyl\*) OR TS=(backpain\*) OR TS=(“back pain”) OR TS=(enthesitis) OR TS=(Enthesopath\*) OR TS=(sacroiliit\*) OR TS=(uveitis) OR TS=(dactylitis) OR TS=("spondylitis, ankylosing") OR TS=("Spondylarthropathies") )

Resultado Web of Science para: a AND b AND c AND d

33 REFERÊNCIAS Web of Science

#### 2.1.4 Critérios de inclusão

A fim de responder a pergunta: qual a correlação das técnicas laboratoriais de análise do HLA-B27 (PCR e CF) no diagnóstico da EA; foram incluídos trabalhos com as características abaixo:

- artigo original, pesquisas em humanos, revisões e revisões sistemáticas;
- trabalhos com texto integral e texto integral gratuito;

- publicações realizadas em qualquer momento da história;
- estudos realizados em humanos;
- artigos no idioma inglês
- trabalhos que envolveram população de pacientes diagnosticados com EA.

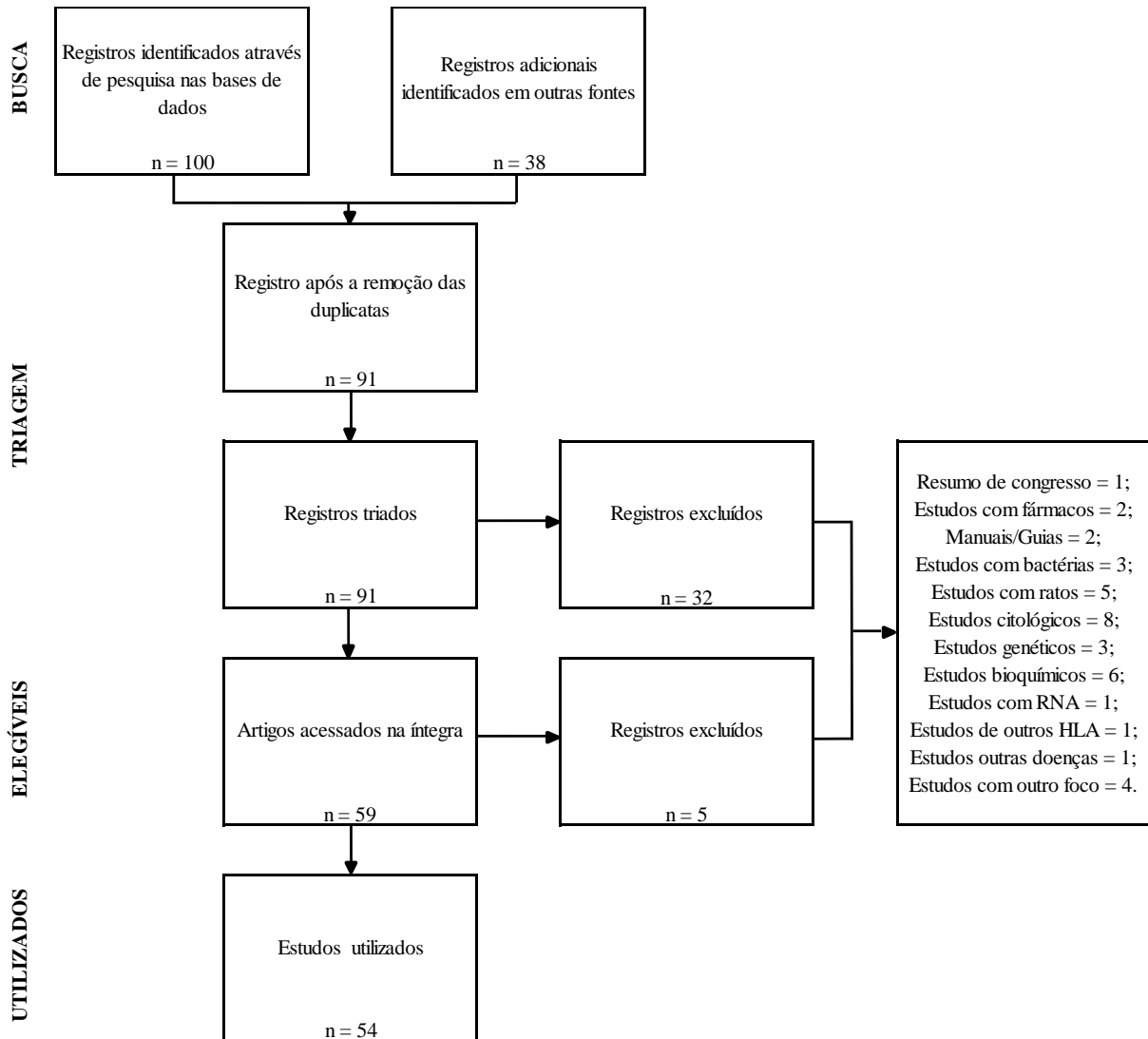
#### 2.1.5 Critérios de exclusão

Por outro lado, foram excluídos estudos com foco em outras artropatias, estudos utilizando pacientes sem diagnóstico definido, relatos de caso, revisões narrativas, editoriais, resumos de congressos, entre outros que não atendam aos critérios de inclusão.

#### 2.1.6 Resultados da busca

Utilizando a estratégia de busca citada anteriormente, foram obtidos 16 artigos através do PubMed, 51 via Scopus, 33 provenientes do Web of Science e 38 por busca manual, o que fez um total de 138 estudos. Eliminando-se as repetições, obteve-se um total de 91 artigos. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados um total de 59 artigos. Destes, 54 foram utilizados para busca de informações relevantes e pertinentes ao tema central desta pesquisa. A seguir, a figura 2 mostra os resultados quantitativos da busca literária nas bases de dados:

**Figura 2:** Resultados quantitativos da busca literária nas bases de dados.



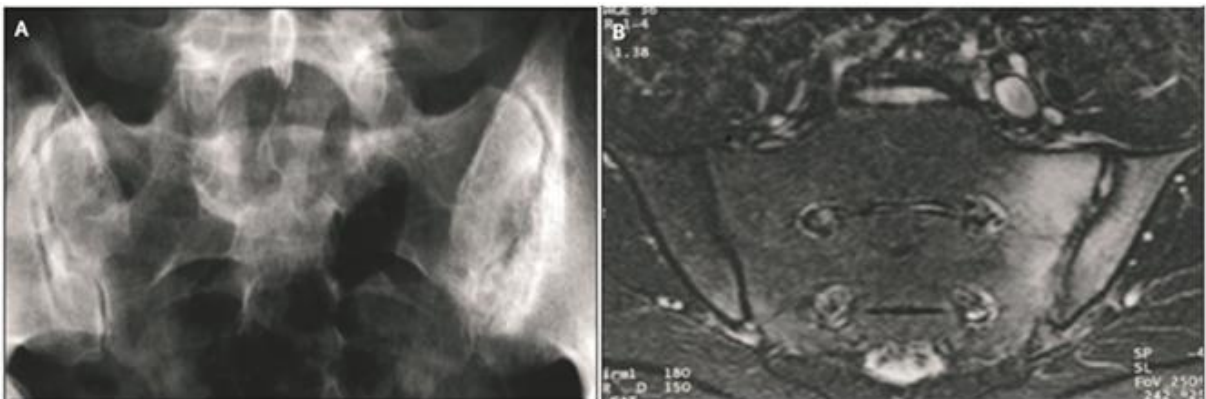
## 2.2 Espondiloartrites com envolvimento axial

A EpA-ax é uma doença articular inflamatória potencialmente incapacitante da coluna vertebral, geralmente apresentando-se como dor nas costas crônica, tipicamente antes dos 45 anos de idade. Muitas vezes, está associada a uma ou mais das várias características articulares, incluindo sinovite, entesite e dactilite. Também pode estar associado a várias

características não articulares que podem incluir uveíte, psoríase e doenças inflamatórias intestinais. Os pacientes frequentemente carregam o marcador genético HLA-B27, e os pacientes com doença ativa geralmente apresentam provas inflamatórias elevadas (3, 24).

Os pacientes com EpA-ax são classificados como tendo um ou dois dos subtipos de EpA: espondilite anquilosante (EA) ou EpA-ax-nr. Pacientes com EA exibem anormalidades radiográficas consistentes com a sacroilíte, mas tais achados não são evidentes na radiografia simples em EpA não-axial. Entretanto, em pacientes com EpA não-axial, o diagnóstico é apoiado por evidências de inflamação ativa das articulações sacroilíacas na ressonância magnética e/ou uma combinação de outros achados, entre eles, a presença do HLA-B27 (24). A figura 4 mostra imagens da pelve de dois pacientes com EpA-ax. Na figura 3A, uma radiografia mostra mudanças crônicas nas articulações sacroilíacas em um paciente com EA, na 3B, a ressonância nuclear magnética revela as mudanças ativas (sacroilíte) em um paciente com EpA-ax-nr.

**Figura 3:** Radiografia convencional e ressonância nuclear magnética da articulação sacroilíaca da região pélvica de dois pacientes com EpA-ax.



Fonte: Braun e Sieper, p. 1382 (15)

Na prática clínica, a distinção entre estas formas de EpA-ax em um paciente individual tem um impacto limitado no gerenciamento e pode não ser relevante, embora a classificação seja de interesse para fins epidemiológicos e outros fins de investigação (24).

### 2.2.1 Espondilite Anquilosante (EA)

A EA atua especialmente sobre as ênteses do esqueleto axial, ocasionando alterações patológicas nas articulações afetadas como inflamação, danos estruturais e formação excessiva de calcificações (3).

**Figura 4:** “Coluna de bambu”, manifestação clássica do estágio avançado da doença.



Fonte: Calin, p. 399 (25)



### 2.2.1.1 Definição, classificação e sintomas da EA

Além de caracterizar-se por um início insidioso de lombalgia e dor nas nádegas, as manifestações associadas à EA incluem rigidez dorsal matinal, dor noturna, dor que não é aliviada pelo repouso, elevação da velocidade de hemossedimentação e presença do antígeno HLA-B27. A inflamação e a erosão das fibras externas do anel fibroso no ponto de contato com o copo vertebral são seguidas de neoformação óssea (sindesmófito) que estabelece pontes entre corpos vertebrais adjacentes e resulta em redução da mobilidade da coluna em todos os planos (figura 5). Fraturas por estresse da coluna osteoporótica rígida podem resultar em dor focal na coluna, compressão da medula espinhal ou síndrome de cauda equina. Em certas ocasiões ocorre subluxação atlantoaxial com compressão da medula espinhal e a redução na altura das estruturas torácicas axiais pode causar comprometimento acentuado da função respiratória (26).

### 2.2.1.2 Epidemiologia da EA

A prevalência da EA estimada é de 0,1 a 1,4% da população geral, na população geral dos Estados Unidos é de 6%, na Europa 4 a 14%, com uma percentagem mais elevada no norte, e na China chega a 8% (13), e a incidência varia de 0,5 a 14 casos novos para cada 100.000 pessoas por ano (6,7). A EA geralmente afeta adultos jovens com idade média de 26 anos, sendo que cerca de 80% desenvolvem os primeiros sintomas antes dos 30 anos e menos de 5% após os 45 anos. Esta patologia acomete homens com maior frequência em uma proporção de 2:1 (8).

A EA tem predileção por homens jovens, embora possa afetar ambos os gêneros em qualquer idade. Sua prevalência varia nas diferentes populações estudadas, na dependência direta da prevalência do HLA-B27 naquela determinada população. Em populações caucasianas, a prevalência do HLA-B27 é de cerca de 90% nos pacientes com EA. Por sua grande positividade nesta doença específica, a determinação do HLA-B27 é bastante útil no diagnóstico. Sabe-se que em pacientes com a chamada “lombalgia inflamatória” e com alterações típicas na ressonância nuclear magnética da coluna e sacroilíacas, a presença do HLA-B27 determina uma probabilidade de cerca de 98% para o diagnóstico de EA. Além do aspecto diagnóstico, a presença deste marcador genético também tem influência prognóstica, na medida em que pacientes com HLA-B27 positivo têm mais acometimento axial e anquilose completa da coluna vertebral, além de apresentarem mais manifestações extra-articulares, especialmente uveíte anterior (27).

#### 2.2.1.3 Etiologia e patogênese da EA

Desde a década de 1970, uma série de hipóteses, cada uma incorporando o conhecimento disponível na época, foram propostas para explicar a patogênese da EA e outras formas de espondiloartrite (EpA). Critérios utilizados para a classificação dessas doenças como os critérios de Roma, critério de Nova York e critério de Nova York modificado, levavam em conta tanto alterações de mobilidade espinhal quanto sacroilíte radiográfica, que são reflexo do tempo de duração da doença e, portanto, ocorrem em fases mais avançadas (28). A partir de 2005, houve uma explosão de conhecimento em várias áreas da biomedicina que convergiram para levar a um progresso substancial na compreensão de EA e teorias em relação à sua patogênese (3) até que, em 2009, foi proposto o consenso do grupo internacional ASAS, a classificação das EpA como axial e periférica (24).

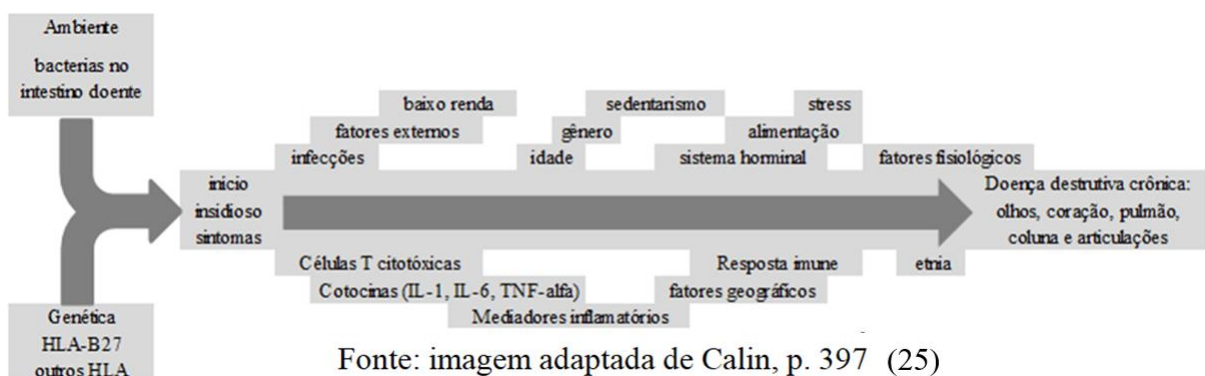
A causa da EA e outras EpA ainda é desconhecida. Além de fatores externos e fisiológicos, existe uma forte influência genética, especialmente no que se refere à EA. Cerca de um terço deste efeito é explicado pela presença do HLA-B27. O risco do desenvolvimento da doença é cerca de 5,0% maior em indivíduos HLA-B27 positivos e, substancialmente mais elevado, em pessoas portadoras do gene e que são parentes de pacientes com EA (29).

A possível interação entre bactérias e HLA-B27 tem um papel crucial nos modelos de patogênese das EpA. O fato de que a artrite reativa é desencadeada por infecções genitourinárias com *Chlamydia trachomatis* ou por enterite causada por enterobactérias gram-negativas, como *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* e *Campylobacter spp* fornece um quadro sólido para essa abordagem (30).

A presença de antígenos microbianos na sinóvia de pacientes com artrite reativa (31) sugeriu que a persistência de antígenos microbianos poderia ser essencial para a contínua inflamação articular. Um papel possivelmente central de bactérias na patogênese das EpA é ainda mais apoiado pela relação entre a doença de Crohn, HLA-B27 positivo e EA: 54% dos pacientes com HLA-B27 e doença de Crohn desenvolvem EA (32).

A figura 5 esquematiza o caminho da doença e sugere fatores que podem a vir influenciar no seu curso.

**Figura 5:** Fatores envolvidos na fisiopatogenia da Espondilite Anquilosante.



As respostas imunes inatas e adaptativas podem ter um papel importante nas EpA. A concentração do fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis fator alfa* - TNF- $\alpha$ ) está aumentada nas articulações sacroilíacas (6) e esta descoberta forneceu uma forte justificativa para o uso de inibidores de TNF- $\alpha$ , que atualmente são muito eficazes no tratamento das EpA.

Na artrite psoriática e na EA um aumento da atividade dos osteoclastos foi relatado (33,34). Os osteoclastos são fundamentais na perda óssea associada em doenças reumáticas (35). Os passos associados à cicatrização óssea incluem uma resposta inflamatória, reabsorção óssea e nova formação óssea. As prostaglandinas demonstraram desencadear e participar de respostas inflamatórias, aumentar a atividade dos osteoclastos e reabsorção óssea subsequente, e aumentar a última atividade de osteoblastos e a nova formação óssea (34, 35).

### **2.3 HLA-B27**

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) foi descoberto a partir da obtenção de rejeição de tecidos transplantados entre camundongos. Jean Dausset, Jon van Rood e seus colegas realizaram as primeiras observações em humanos na década de cinquenta, verificando a capacidade que os soros de indivíduos submetidos à transfusão sanguínea tinham de aglutinar leucócitos de outros indivíduos. Estes pacientes frequentemente continham anticorpos circulantes que reagem com antígenos expressos na superfície de leucócitos. Pela observação de Dausset e seus colegas, o MHC humano continha o chamado de sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA – *Human Leucocyte Antigen*) (36).

O MHC refere-se a uma região genética contendo centenas de genes, incluindo os genes do HLA (Figura 1). O MHC é um termo usado para descrever um grupo de genes em animais e seres humanos que codificam uma variedade de marcadores de superfície celular,

moléculas apresentadoras de antígenos e outras proteínas envolvidas na função imune. O sistema de HLA é sinônimo de MHC humano, sendo dessa forma, a região MHC humana também referida como região HLA. Os genes HLA expressam seus produtos de genes na superfície de glóbulos brancos e foram originalmente reconhecidos para conter os genes que codificam "antígenos de tecido" ou "tipos de tecido". A função destes genes foi revelada em estudos de roedores, nos quais foram identificados como os fatores responsáveis pela rejeição de enxertos de tecido entre indivíduos incomparáveis (37).

A região HLA fica no braço curto do cromossomo seis, na posição 6p21.3. O MHC clássico abrange 3.6 megabases (Mb) e inclui mais de 200 genes, muitos dos quais não são conhecidos por estarem envolvidos na função imune. A localização de genes relevantes para o MHC fora dos limites clássicos desta região e a confirmação do desequilíbrio de ligação prolongada levaram, desde então, à proposta de um MHC prolongado que abrange 7,6 Mb e contém mais de 400 loci (38, 39).

Existe três regiões codificadoras e somente os das classes I e a classe II estão envolvidos na resposta imune e estão presentes em muitos outros tipos de tecidos e células, podendo expressar antígenos HLA classe I, que compreendem os *loci* HLA-A, -B e -C (40).

A molécula de HLA classe I (figura 1) consiste de duas cadeias polipeptídicas, sendo uma cadeia  $\alpha$  e uma  $\beta$  2 microglobulina. Cada cadeia é codificada por diferentes genes: a cadeia alfa é pelo cromossomo 6 e a beta 2 microglobulina, pelo 15. Os domínios alfa1 e alfa2 respondem pelo polimorfismo da molécula HLA classe I. Esta porção da molécula forma uma alfa hélice no topo da molécula, cuja interação com peptídeos acontece nesta região. O domínio alfa3 é uma região constante em todas as moléculas classe I e está ancorado na membrana celular (36, 40).

As primeiras associações de HLA com doenças reumáticas, como a associação do alelo HLA-B27 no gene HLA-B com risco de EA e a associação do alelo HLA-DRB1 \* 04 no

gene HLA-DRB1 com artrite reumatoide (AR), foram descobertas há várias décadas. O HLA-B27, desde então, tem sido visto como o pivô na patogênese dos eventos da EA fazendo com que as pesquisas nessa área se intensificassem. Nos últimos quarenta anos, perto de uma centena de diferentes alelos do HLA-B27 foram identificados, mas nada conclusivo foi descoberto o que retoma a necessidade de estudos adicionais (41).

### 2.3.1 Metodologias disponíveis para triagem do HLA-B27

Metodologias como o Teste de Microlinfotoxicidade e o ELISA surgiram como opções na busca pelo HLA-B27 (29). Ambos tem seu fundamento calcados na busca por anticorpos capazes de detectar o marcador genético. Apesar de a PCR ser a técnica considerada padrão ouro, não é pouco frequente encontrarmos pacientes com laudos obtidos por meio da CF.

#### 2.3.1.1 Reação da Cadeia da Polymerase (PCR)

Os métodos moleculares utilizam a PCR para amplificar segmentos específicos do DNA. Na PCR, o processo consiste na utilização de uma mistura composta por DNA-Polymerase termoestável, dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), desoxirribonucleotídeos livres (dNTPS) – Adenina, Timina, Citosina e Guanina), tampão de reação, concentração adequada de  $MgCl_2$  e o DNA com a sequencia-alvo (42).

A reação de amplificação é composta por três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A desnaturação ocorre pelo aquecimento (95-96°C) da mistura dos componentes da reação. Este processo permite a separação da dupla fita de DNA, gerando fitas unifilamentares de DNA. Na segunda etapa, ocorre o anelamento dos *primers* iniciadores às sequencias de DNA complementares através da diminuição da temperatura (45-65°C). Por fim, ocorre um

aumento de temperatura (68-72°C) para que haja a polimerização da nova fita de DNA, com o consumo da taq Polymerase, MgCl<sub>2</sub> e dos dNTPS (42).

Os métodos moleculares utilizados para a genotipagem do HLA-B27 são: RFLP, PCR-SS-, microarranjos e sequenciamento de DNA (43, 44). O método comumente utilizado é o PCR-SSP. Suas vantagens são a robustez e o baixo custo quando comparado aos demais métodos.

O método de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*) se baseia no princípio de que, sob condições de PCR estritamente controladas, o anelamento os pares de *primers* com pareamento traduzem-se na amplificação de sequencia alvo. Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados são separados em gel de agarose corado por um intercalante de DNA (p. ex. brometo de etídeo) e visualizados sob luz ultravioleta. A interpretação dos resultados de PCR-SSP baseia-se na presença ou ausência de um fragmento específico de DNA amplificado. O tamanho dos fragmentos amplificados é comparado a um padrão de peso molecular (42).

#### 2.3.1.2 Citometria de Fluxo (CF)

A CF é uma tecnologia empregada na pesquisa e em laboratórios clínicos, sendo capaz de analisar simultaneamente diversos parâmetros de células ou partículas em uma suspensão. Seu princípio está na incidência de uma fonte de luz laser que intercepta cada partícula em uma suspensão que flui através de um sistema de análise fazendo com que a luz disperse e forneça dados relativos ao tamanho e à complexidade das partículas suspensas. Moléculas ou estruturas de interesse podem ser estudadas por marcação com fluorocromos ou anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos (45).

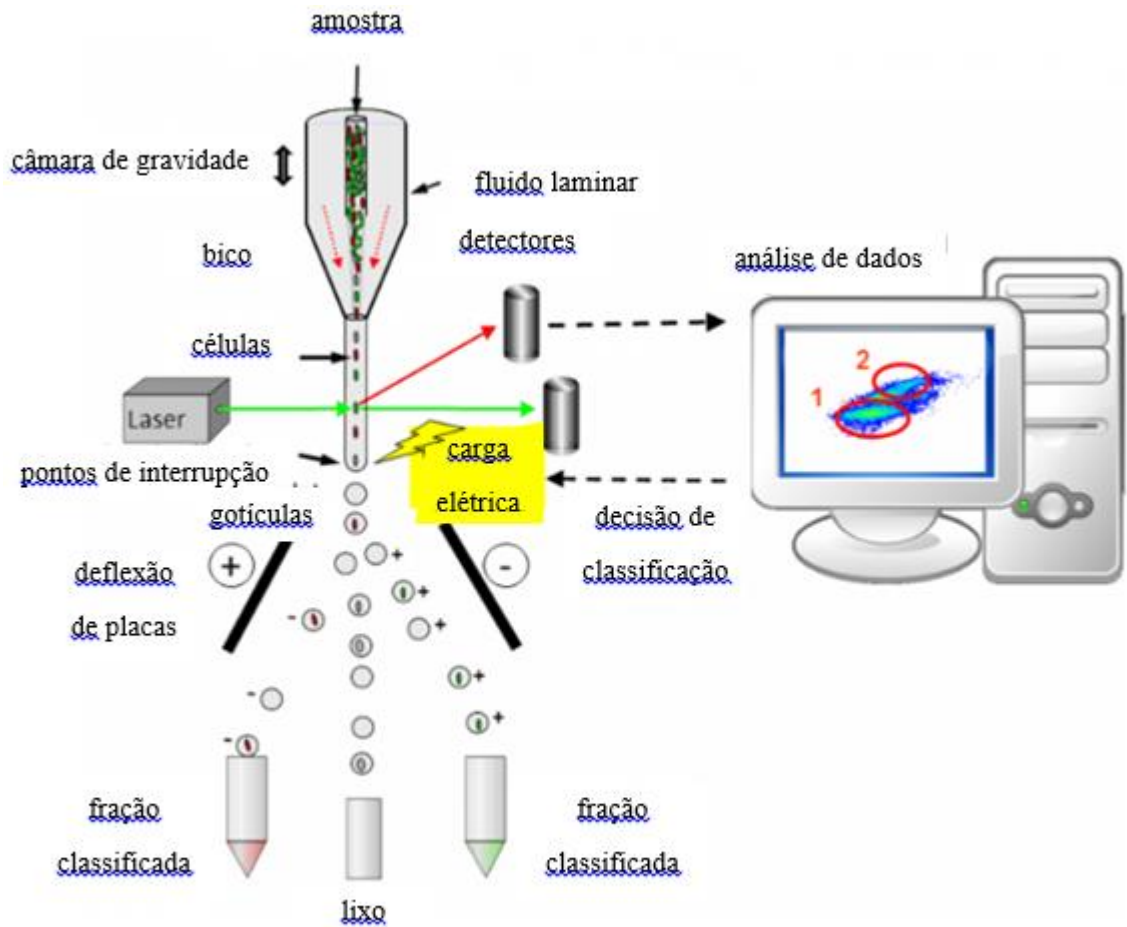
O processo se inicia com a seleção de anticorpos, marcados com fluorocromos e específicos para o antígeno celular que permite caracterizar a população das células de

interesse. Após o processamento da amostra, obtida a partir de fluidos ou processamento de tecidos sólidos, uma suspensão de células é introduzida no aparelho, fluindo em direção a um laser posicionado no caminho das células. Como o fluxo das células é laminar e o diâmetro do tubo se afunila, as células são forçadas a passar em fila única pela luz emitida pelo laser. O fluorocromo ligado ao anticorpo absorve a energia do laser e rapidamente emite essa energia em forma de luz, em comprimentos de ondas específicos de acordo com o fluorocromo empregado. A luz emitida é captada por um sistema óptico que é sensível a diferentes comprimentos de onda, permitindo que um ou mais marcadores sejam lidos ao mesmo tempo, transferindo essas informações para um computador acoplado ao sistema. Programas especializados podem, então, representar graficamente, em formatos uni, bi ou tridimensional, a distribuição de populações celulares marcadas (46).

A dinâmica funcional de um citômetro é composta por cinco sistemas: fluido, óptico, eletrônico, de amplificação e computacional. Em geral, os citômetros de fluxo são compostos por dois ou mais tipos de *lasers*, que ampliam a capacidade de medições multiparamétricas. A luz monocromática, estável e de alta potência, é a mais utilizada em citômetros de fluxo, os *lasers* podem emitir feixes de luz fixa ou podem ser sintonizáveis, por ser de alta potência são refrigerados à água, enquanto que os de baixo poder são refrigerados a ar. O laser empregado com maior frequência na FC é o laser íons de argônio com emissão de 488nm, que permite maior excitação em fluorocromos, como a Anexina V, brometo de propídeo, FITC, PE, PI, PerCP, 7-AAD, laranja de acridina, entre outros (47).



**Figure 6:** Princípio do processo de funcionamento do citômetro de fluxo.



Fonte: <https://www.mpi-bremen.de/Durchflusszytometrie.html> (48)

A caracterização de células em diferentes estádios de desenvolvimento através do uso de anticorpos monoclonais marcados com fluorescência contra marcadores de superfície é uma das aplicações mais comuns de citometria de fluxo.

Equipamento como o BD FACSCalibur® permitem realizar análises e triagens de células em um suporte multicolor, tecnologia de *laser* dual (um *laser* de argônio refrigerado a ar e um *laser* de diodo vermelho) podendo manipular ensaios em placas de microtitulação de 96 ou 384 poços, garante resultados objetivos e reproduzíveis com alta sensibilidade, compensação mínima e flexibilidade máxima na escolha dos fluorocromos (49).

### **3 MARCO TEÓRICO**

As EpA abrangem um grupo de doenças reumáticas inflamatórias e debilitantes que acometem principalmente adultos jovens caucasianos do gênero masculino (9). Essas doenças, dentre elas a EA, compartilham características clínicas, que nos estágios iniciais podem ser um fator complicador para a sua caracterização (28). Por outro lado, a associação marcante com o HLA-B27 possibilita a diferenciação entre os subconjuntos de EpA e a definição desse marcador pode ajudar o médico a definir o diagnóstico do paciente (4, 5, 9, 50).

Várias são as técnicas laboratoriais disponíveis para investigar o HLA-B27, mas sua aplicabilidade depende de fatores como custo e tempo. Nesse sentido, a escolha da estratégia mais adequada para verificar o marcador é um ponto crucial no intuito de abreviar o tempo até a definição da doença e abrandar a evolução dos sintomas dos pacientes.

#### **4 JUSTIFICATIVA**

A determinação analítica do HLA-B27 é de fundamental importância para o diagnóstico, e impacta diretamente no prognóstico de pacientes com EA, na medida em que pacientes HLA-B27 positivos apresentam maior prevalência e gravidade do acometimento axial. Além disto, essa população de pacientes apresenta mais acometimento extrarticular, especialmente uveíte anterior.

A PCR é a técnica considerada padrão-ouro para a pesquisa do HLA-B27, mas seu elevado custo e baixa oferta limitam seu uso cabendo ao médico optar por outras metodologias como a CF, que pode apresentar resultados falsamente positivos. Por se tratar de um marcador genético e, portanto, não passível de variação, essa discordância por vezes observada na prática clínica denota a eventual imprecisão do resultado. Devido à escassez de estudos a este respeito na literatura médica internacional e a inexistência de qualquer estudo em população de pacientes brasileiros com EA, justifica-se a realização desta pesquisa.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo primário**

Determinar a taxa de concordância de duas técnicas laboratoriais (Reação em Cadeia de Polymerase e Citometria de Fluxo) na pesquisa do antígeno HLA-B27 em pacientes com Espondiloartrite Axial (EpA-ax).

### **5.2. Objetivos secundários**

Caracterizar os achados clínicos e laboratoriais da amostra de pacientes com EA estudada.

Avaliar a prevalência do antígeno HLA-B27 usando a técnica por Citometria de Fluxo na amostra de pacientes com EA estudada.

Avaliar a prevalência do antígeno HLA-B27 usando a técnica por Reação em Cadeia de Polymerase na amostra de pacientes com EA estudada.

Comparar características clínicas e laboratoriais de acordo com a presença/ausência do antígeno HLA-B27 na amostra de pacientes com EA estudada.

## 6 REFERÊNCIAS

## 6 REFERÊNCIAS

1. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009;68:777-83.
2. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:25.
3. Yu DT, Tubergen AV. Pathogenesis of spondyloarthritis. In: Romain PL, ed. *UpToDate*. 2017. Available at: <https://www.uptodate.com/contents/search?search=hla+b27&x=0&y=0>. Accessed November 22, 2017.
4. Sieper J, Braun J, Dougados M, Baeten D. Axial spondyloarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*.2015;v1:1-16.

5. Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwaleit M, Distler A. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum.*1998;41:58-67.
6. Braun J, Baraliakos X, Listing J, Sieper J. Decreased incidence of anterior uveitis in patients with ankylosing spondylitis treated with the anti-tumor necrosis factor agents infliximab and etanercept. *Arthritis Rheum.*2005;52(8):2447-2451.
7. Akkoc N, Khan MA. Epidemiology of ankylosing spondylitis and related spondyloarthropathies. In: Weisman MH, Reveille JD, van der Heijde D, eds. *Ankylosing spondylitis and the spondyloarthropathies*. London: Mosby. 2005;117-131.
8. Bakland G, Nossent HC, Gran JT. Incidence and prevalence of ankylosing spondylitis in Northern Norway. *Arthritis Rheum* 2005; 53:850-855.
9. Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, van der Linden S, Braun J. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2003;23:61–66.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 640, de 24 de junho de 2014**. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Espondilite Ancilosante. Disponível em: <[portalarquivos.saude.gov.br/.../2014/julho/25/pcdt-espondilite-anquilosante-2014](http://portalarquivos.saude.gov.br/.../2014/julho/25/pcdt-espondilite-anquilosante-2014)>. Acesso em: 30 nov. 2017.

11. Cure E, Icli A, Sakiz D, Cure MC, Baykara RA, Yavuz F, et al. Atheriogenic index of plasma: a useful marker for subclinical atherosclerosis in ankylosing spondylitis. *Clinical Rheumatology*. Springer; 2017.
12. Torres TM, Ferraz MB, Ciconelli RM. Resource utilisation and cost of ankylosing spondylitis in Brazil. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(4):490-7.
13. Sampaio-Barros PD. Epidemiology of spondyloarthritis in Brazil. *Am J Med Sci*. 2011;341(4):287-8
14. Gallinaro AL, Akagawa LL, Otuzi MH, Sampaio-Barros PD, Goncalves CR. Sexual activity in ankylosing spondylitis. *Rev Bras Reumatol*. 2012;52(6):887-91.
15. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet*. 2007;369:1379-1390.
16. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*. 1973;301:904–907.
17. Barros PD, Azevedo VF, Bonfiglioli R, Campos WR, Carneiro SC, Carvalho MA. Consenso Brasileiro de Espondiloartrites: Espondilite anquilosante e artrite psoriásica diagnóstico e tratamento – primeira revisão. *Rev Bras Reumatol*. 2007;47:232–243.
18. Darke C, Coates E. One-Tube HLAB27 /B2708 Typing by Flow Cytometry Using Two “Anti-HLA-B27” Monoclonal Antibody Reagents. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 78B:21–30 (2010).

19. Seipp MT, Erali M, Wies RL, Wittwer C. HLA-B27 Typing: Evaluation of an Allele-Specific PCR Melting Assay and Two Flow Cytometric Antigen Assays. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 63B:10–15 (2005).
20. Bonnaud G, Aupetit C, Preux PM, Cogné M, Drouet M. Optimisation of HLA-B27 Testing by Association of Flow Cytometry and DNA Typing. *Clin Rheumatol* (1999) 18:23–27.
21. Chou SJ, Lai NS, Su JP, Wu JL, Lan JL. Two color analysis of HLA-B27 antigen by flow cytometer--a comparative study by conventional microlymphocytotoxicity, DNA genotyping polymerase chain reaction and flow cytometric measurement. *J Clin Lab Anal.* 1997;11(6):369-73.
22. Cauli, A, Dessole G, Fiorillo MT, Vacca A, Marnelli A, Bitti P, et al. Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease. *Rheumatology* 2002;41:1375–1379.
23. Chou CT, Tsai YF, Liu J, Wei JC, Liao TS, Chen ML, Liu LY. . The detection of the HLA-B27 antigen by immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay\_comparison with a flow cytometric procedure. *J Immunol Methods.* 2001 Sep 1;255(1-2):15-22.
24. Deodhar A, Strand V, Kay J, Braun J. The term 'non-radiographic axial spondyloarthritis' is much more important to classify than to diagnose patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75:791.



25. Calin A. Ankylosing spondylitis. SPONDYLOARTHROPATHIES. *Medicine*. 2016;34:10 (396-400).
26. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editores. *Harrison on principios de medicina interna*. Vol 1. 18a ed. México: McGraw-Hill; 2012.
27. Casey B, O’Hanlon É, Curran M, Costello M, McGlennon S, Pond P. *Living with a Chronic Disease – The Story of Ankylosing Spondylitis*.
28. Ferreira ALM, Alvarenga CQM, Barcelos GF, Polito ETL (2008). Espondilite Anquilosane. *Atualização em Reumatologia*. 2008;48(4):243-247.
29. Van Der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum* 1984;27:241–19.
30. Sieper J, Braun J, Kingsley GH. Report on the fourth international workshop on reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:720–34
31. Cavanagh LL, Boyce A, Smth L, Jagadish P, Filgueira L, Pietschmann P, Ranjany T. Rheumatoid arthritis synovium ontains plasmacytoid dendritic cells. Availabe form: <http://arthritis-research.com/content/7/2/R230>. Acessado em: 22 nov. 2017.

32. Purrmann J, Zeidler H, Bertrams J, et al. HLA antigens in ankylosing spondylitis associated with Crohn's disease. Increased frequency of the HLA phenotype B27,B44. *J Rheumatol* 1988;15:1658–61.
33. Ritchlin CT, Hass-Smith SA, Li P, Hicks G, Schwarz M. Mechanisms of TNF- $\alpha$  and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(6):821-831.
34. Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, Kohler D, Zacher J, Stein H, Sieper J, Loddenkemper C. Immunohistochemical analysis of hip arthritis in ankylosing spondylitis: evaluation of the bone-cartilage interface and subchondral bone marrow. *Arthritis Rheum*. 2006;Jun;54(6):1805-13.
35. Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravalles EM. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunol Rev*. 2005;Dec;208:228-51.
36. Abbas AKL, A.H., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*: Elsevier Inc.; 2007.
37. Viatte S. Human leukocyte antigens (HLA): A roadmap. In: Romain PL, ed. *UpToDate*. 2017. Available form:< [https://www.uptodate.com/contents/human-leukocyte-antigens-hla-a-roadmap?source=search\\_result&search=hla+b27&selectedTitle=3~62](https://www.uptodate.com/contents/human-leukocyte-antigens-hla-a-roadmap?source=search_result&search=hla+b27&selectedTitle=3~62)> Accessed November 23, 2017.

38. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004; 64:631.
39. Horton R, Wilming L, Rand V, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 2004; 5:889.
40. Wintrobe MM. *Wintrobe's clinical hematology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
41. Evans DM, Spencer CC, Pointon JJ, Su Z, Harvey D, Kochan G, Oppermann U, Dilthey A, Pirinen M, Stone MA, Appleton L, et al., 2011. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature Genetics* 43, 761-767.
42. Zaha AF, HB; Passaglia LMP. *Biologia Molecular Básica*: Artmed; 2012.
43. Conti F, Bertrand G, Dezan M, Costa T, Aravechia M, Mota M, et al. Molecular HPA genotyping microarray in Brazilian blood Transfusion. 2014;54(2):405-11. Epub 2013/06/15.
44. Brouk H, Halle L, Bertrand G, NEche FZ, Ouella H, Kaplan C. Human platelet antigen allele frequencies in different Algerian populations. *Tissue antigens*. 2010;75(6):673-8. Epub 2010/02/13.

45. Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas – USP. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014; acessado em: 23 nov. 2017. Disponível em: <[http://www.icb.usp.br/~imunoicb/?page\\_id=295](http://www.icb.usp.br/~imunoicb/?page_id=295)>.
46. Fang Y, Ramasamy RP. Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. *Biosensors*, v. 4, p. 537-561, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-6374/5/3/537>>. doi:10.3390/bios5030537.
47. Bertho AL. Apostila de Citometria de fluxo. Disponível em: <<http://picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc>>. Acesso em: 21 set. 2015.
48. Max Planck Institut fur Marine Mikrobiologie. What is Flow Cytometry?. Available form: <<https://www.mpi-bremen.de/Durchflusszytometrie.html>>. Accessed at: 30 nov. 2017.
49. Becton, Dickinson and Company (2009). BD flow cytometers are Class I (1) laser products. Available form: <<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=33664>> Accessed at: 04 nov. 2017.
50. Sharma N, Sharma V, Masood T, Nautiyal SC, Sailwal S, Singh RK, Kushwaha RK, Singh RK (2013). Usage of Conventional PCR Technology for the Detection of HLA-B27 Allele: A Significant Molecular Marker of Ankylosing Spondylitis. *Ind J Clin Biochem*. 2013;28(2):189–192.

## **7 ARTIGO**

A escolha do idioma do artigo deve-se à necessidade em atender os requisitos exigidos para submissão à publicação na Revista Brasileira de Reumatologia (ISSN 0482-5004, versão impressa; ISSN 1809-4570 versão online).

**Estudo comparativo de duas técnicas laboratoriais para detecção do HLA-B27 em  
pacientes portadores de espondiloartrite axial**

Ricardo dos Santos Angeli<sup>1</sup>, Charles Lubianca Kohem<sup>2</sup>, Penélope Esther Palominos<sup>2</sup>, Everton Hiraiwa Abegg<sup>3</sup>, Matheus Predebon Duarte<sup>3</sup>, Mateus Antônio Zeni<sup>3</sup>, Humberto Butzke Mota<sup>3</sup>, Luciana Cantarelli Casagrande<sup>3</sup>, Bruna Schafer Rojas<sup>3</sup>, Bruna Sessim Gomes<sup>3</sup>, Camilla Regina de Souza Madeira<sup>4</sup>, Ricardo Machado Xavier<sup>2</sup>, Odirlei André Monticielo<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup>Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Controle de Qualidade, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

Contato responsável: Ricardo dos Santos Angeli

Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Rua Ramiro Barcelos, 2350/645, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brasil.

E-mail: angeli.ricardo@gmail.com

## Resumo

**Introdução:** O antígeno leucocitário humano B-27 (HLA-B27) tem valor diagnóstico e prognóstico na Espondiloartrite Axial (EpA-ax), já que 90,0% dos pacientes com Espondilite Anquilosante (EA) possuem o gene B27 em comparação com apenas 8,0% de indivíduos saudáveis e esse alelo está associado à maior prevalência de doença axial e uveíte. A citometria de fluxo (CF) e a Reação em Cadeia de Polymerase (PCR) são técnicas geralmente utilizadas para a tipagem do HLA-B27 de rotina.

**Objetivo:** Avaliar a concordância da CF e PCR em uma amostra de pacientes brasileiros com EpA-ax.

**Pacientes e Métodos:** Neste estudo transversal foi conduzido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, um hospital público universitário. A amostra, recrutada por conveniência na clínica de SpA, foi composta por pacientes ambulatoriais com idade  $\geq 18$  anos, preenchendo os critérios de Avaliação da Espondiloartrite (ASAS). Todos os participantes foram submetidos a tipagem HLA-B27 por meio de FC e PCR. A estatística kappa foi usada para calcular a concordância entre o FC e a PCR, considerando um valor  $P < 0,05$  estatisticamente significativo. Tomando PCR como o padrão-ouro, sensibilidade e especificidade de FC para detectar HLA-B27 foram calculados.

**Resultados:** O estudo contou com um total de 62 pacientes sendo 40 (64,5%) do gênero masculino e 55 (88,7%) caucasianos. A idade média apresentada foi de  $54,5 \pm 12,3$  anos e o tempo mediano de doença, 14,0 (9, 24) anos. As manifestações clínicas dividem-se em Psoríase (3 (4,8%)), Uveíte (25 (40,3%)), Estesite (28 (45,2)), Artrite periférica (17 (27,4%)), Dactilite (9 (14,5%)) e sacroiliíte (60 (96,8%)). Do total de indivíduos, 56 (90,3%) apresentaram tipagem positiva de HLA-B27 por CF e 49 (79,0%) pela técnica de PCR. Utilizando o PCR como padrão ouro, a CF apresentou sensibilidade de 98,0% e uma

especificidade de 38,5%. O Valor Preditivo Positivo (VPP) da CF foi de 85,7% e o Valor Preditivo Negativo (VPL) foi de 83,5%. Assim, uma precisão do CF foi de 85,5% nos resultados de suas análises. O coeficiente kappa de concordância entre CF e PCR foi  $\kappa = 0,454$  ( $p < 0,05$ ).

Conclusão: A CF apresentou alta sensibilidade e boa precisão, mas baixa especificidade na detecção do HLA-B27, em comparação com a PCR. No entanto, é mais barato e menos trabalhosa do que PCR, tornando-se uma escolha razoável como um método de triagem na prática clínica.

**Palavras chaves:**

Espondilite Anquilosante, Espondiloartrite axial, HLA-B27, Citometria de Fluxo, Reação em Cadeia da Polimerase.



## Introdução

As espondiloartrites axiais (EpA-ax) são doenças inflamatórias crônicas que acometem preferencialmente a coluna vertebral, podendo evoluir com anquilose dessa estrutura. Afetam também as enteses e as articulações periféricas, levando à destruição articular e consequente incapacidade física. São subdivididas em Espondilite Anquilosante (EA) quando existe alteração radiográfica das articulações sacroilíacas e Espondiloartrites axiais não-radiográficas (EpA-ax-nr) (1, 2). A EA é uma doença insidiosa e potencialmente debilitante que leva à redução na qualidade de vida dos indivíduos acometidos (3). Sua prevalência estimada atinge 0,9% em todo o mundo e a incidência varia entre 0,4 e 14 casos para cada 100.000 pessoas por ano (4, 5). A EA geralmente afeta adultos jovens com idade entre 20 e 30 anos, sendo que cerca de 80,0% desenvolvem os primeiros sintomas antes dos 30 anos e menos de 5,0% após os 45 anos de idade. Esta doença acomete homens com maior frequência em uma proporção de 2:1 (6).

Em virtude do surgimento de novos tratamentos para as EpA-ax, o diagnóstico precoce e a caracterização clínica da doença tornou-se muito importante (7). Na definição do diagnóstico, a pesquisa do *Human Leukocyte Antigen-B27* (HLA-B27), dosagem de marcadores de atividade inflamatória e a realização de radiografias, especialmente do eixo axial, são utilizadas rotineiramente (8).

Há uma forte associação entre a presença do HLA-B27 e EA, apesar do seu papel fisiopatogênico ainda não estar completamente esclarecido (8). Cerca de 90 a 95% dos pacientes caucasianos portadores de EA apresentam soropositividade para o HLA-B27 (9). O risco relativo determinado pela HLA-B27 na EA é o maior entre as doenças com predisposição genética determinada pelo MHC (10). Métodos sorológicos e a Citometria de Fluxo (CF) são utilizados na pesquisa o HLA-B27. Sua especificidade é questionável, no

entanto, o que leva a aplicação de técnicas de genotipagem, como a Reação em Cadeia da Polimerase, em inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR), nos laboratórios clínicos (11-13). A Citometria de Fluxo (CF) é uma metodologia amplamente utilizada, economicamente viável, relativamente simples de ser executada e demonstra uma alta sensibilidade quando compara às técnicas moleculares, como a PCR, que é mais demorada e trabalhosa (11-14).

Não há um consenso na literatura sobre qual a melhor técnica e, na prática clínica, tem se observado resultados discrepantes. Existem poucos estudos comparando diretamente estas duas metodologias e não há nenhum estudo em amostra de pacientes na população brasileira (12-15). O objetivo deste estudo é comparar a concordância entre a CF e a PCR em uma amostra de pacientes com diagnóstico estabelecido de EpA-ax.

## **Materiais e métodos**

### *Pacientes e desenho do estudo*

Trata-se de um estudo transversal com uma amostra de pacientes maiores de 18 anos de idade, selecionados por conveniência, recrutados ao longo de 2015, com diagnóstico estabelecido de EpA-ax, segundo o Critério de Nova York (2, 8, 19). Os pacientes elegíveis para este estudo fazem acompanhamento regular no ambulatório de EpA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), um hospital público universitário. Todos os pacientes analisados assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética do HCPA.

### *Variáveis clínicas e laboratoriais*

Os dados clínicos e epidemiológicos coletados incluíram: idade, gênero, cor da pele (por autodenominação), tempo de doença, presença de psoríase, uveíte, entesite, artrite

periférica (presença de artrite no esqueleto apendicular), dactilite e sacroiliíte, definida por radiologia convencional. Todos os pacientes realizaram a tipagem do HLA-B27 por PCR de Primer de Sequencia Específica, no idioma inglês (*Sequence Specific Primer (SSP)*), PCR-SPP, e CF, paralelamente. A técnica molecular escolhida em nosso estudo utilizou somente reagentes desenvolvidos pelo HCPA. Estas informações foram inseridas em um banco de dados virtual chamado RedCap, disponibilizado pelo Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do HCPA.

As análises feitas por CF foram realizadas em um laboratório externo de apoio, enquanto as de PCR no HCPA. Para cada um dos testes, um volume de 5,0 mL de sangue venoso foi coletado em um tubo de ensaio esterilizado contendo anticoagulante *Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 5,0%*. O armazenamento foi feito em geladeira (2 - 8°C) e as amostras processadas em até 24 horas a partir do momento da coleta.

#### *Métodos analíticos usados*

##### *Citometria de Fluxo (CF).*

As análises em sangue total foram processadas por CF conforme descrito por Arlindo, et. al, 2017 (20). Cada uma das amostras teve 50 µL de sangue periférico anticoagulado com EDTA incubados com 10 µL do reagente da marca CYTOGNOS® contendo dois anticorpos monoclonais conjugados: HLA-B27 marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) / HLA-B7 com R-ficoeritrina (PE) (21). A mistura da amostra com o reagente foi incubada durante 20 minutos no escuro e em temperatura ambiente. As hemácias foram lisadas por incubação com solução de lise Excellyse I® durante 5 minutos, seguida por incubação com água destilada durante 10 minutos. As amostras foram centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato salino (22). As células foram adquiridas imediatamente em um citômetro de

fluxo de 4-cores FACSCalibur® com o software CellQuest® Pro após procedimentos de controle de qualidade. Foram adquiridos cerca de 100.000 eventos por amostra (23, 24).

A análise dos gráficos foi realizada no software CytoPaintClassic 1.1®. Após a exclusão de debris, a região de linfócitos foi selecionada e foi avaliada a expressão de HLA-B27 e HLA-B7. A definição de eventos positivos e eventos negativos foi obtida com uso de controle negativo (células não marcadas). Os dados foram interpretados com base nas informações obtidas a partir dos gráficos (figura 1).

#### *Reação em Cadeia da Polymerase (PCR)*

O método de tipagem HLA foi o PCR-SSP, conforme protocolo *in house* e que foi utilizado como referência neste trabalho.

Cada uma das amostras teve seu DNA extraído a partir da hemólise de 5,0 mL de sangue total com EDTA, via técnica de *salting-out*. Resumidamente, 1,0 µL de todo o DNA obtido foi misturado em um tubo contendo 1,5 µL de *primers* e 7,0 µL de uma solução inicial composta por: 50 µL de TDMH (Tris, dNPTs, MgCl<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O), 24,5 µL de água ultrapura e a 1,0 µL de *Taq Polymerase*. Essa mistura foi colocada em um termociclador (Applied Biosystems®), onde fez 31 ciclos: ciclo I (96°C por 60 segundos); ciclo II (96°C por 20 segundos, 70°C por 45 segundos e 72°C por 25 segundos); ciclo III (96°C por 25 segundos, 65°C por 50 segundos, 72°C por 30 segundos); ciclo IV (96°C por 30 segundos, 55°C por 60 segundos, 72°C por 90 segundos); ciclo V (20°C por 60 segundos). Os ciclos I e V, realizados uma vez apenas, os ciclos II e IV, cinco vezes cada e o ciclo III, vinte uma vezes. Após essas etapas a amostra fica a 4°C por tempo indeterminado. Vinte e dois microlitros do material amplificado no termociclador foram homogeneizados suavemente com 7,0 µL de um corante Orange G, facilitador de visualização, e transferidos para os poços do gel de agarose a 2,0% e brometo de etídeo. O gel contendo o material amplificado e homogeneizado com corante foi

submetido, durante 30 minutos, ao processo de eletroforese em corrente de voltagem de 75 V e 170 mA. Terminado esse tempo, o gel é colocado em transluminador UV e fotodocumentado para análise. O produto da amplificação e da corrida em gel de agarose produz resultados visíveis, interpretados com base na observação das bandas: banda de controle interno (com 796 pares de bases (pb)) e banda positiva (com 150 pb), conforme pode ser visto na figura 2.

### *Análise estatística*

Inicialmente, os dados foram digitados numa planilha do programa Excel e depois exportados para o programa SPSS v. 20.0 para análise estatística. As variáveis categóricas foram descritas por frequências e percentuais. As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas pela média e o desvio padrão e as com distribuição assimétrica pela mediana e o intervalo interquartil (25 e 75).

O teste Exato de Fisher foi usado para comparar as variáveis categóricas. As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram comparadas pelo teste t de Student para amostras independentes. As variáveis com distribuição assimétrica foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney.

As medidas de desempenho (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia) para a CF considerando o PCR como padrão ouro foram obtidas. A concordância entre a CF e o PCR foi descrita através do teste *Kappa* de concordância. Foi considerado um nível de significância de 5,0% para as análises estatísticas.

Os valores de kappa considerados foram baseados conforme classificação proposta por Landis e Koch, em 1977 (25).

## Resultados

O estudo incluiu 62 pacientes com EpA-ax (60 com EA e 2 com EpA-ax não radiográfica), sendo 64,5% (40) do sexo masculino, 88,7% (55) autodeclarados da cor branca, com idade média ( $\pm$  desvio padrão) de  $54,5 \pm 12$  anos e o tempo mediano (percentis 25 e 75) de diagnóstico de 14 (9 e 24) anos. A figura 3 reporta o fluxo de recrutamento dos participantes do estudo.

A frequência das características clínicas estudadas foi: psoríase (4,8% (n=3)), uveíte (40,3% (n=25)), entesite (45,2% (n=28)), artrite periférica (27,4% (n=17)), dactilite (14,5% (n=9)) e sacroiliíte (96,8% (n=60)). A tabela 1 detalha estas informações e analisa a diferença do desempenho das características clínicas em relação a presença ou ausência do antígeno HLA-B27 detectado por PCR. Houve diferença estatisticamente significativa para a artrite periférica, sendo mais frequente no grupo HLA-B27 negativo que no grupo HLA-B27 positivo ( $P=0,032$ ).

A análise de concordância está demonstrada na tabela 2. 90,3% (n=6) dos pacientes apresentaram tipagem HLA-B27 positiva por CF e 79,0% (n=49) pela técnica de PCR. Considerando o PCR como padrão ouro, a CF apresentou uma sensibilidade de 98,0%. 9,7% (n=6) pacientes apresentaram resultados negativos para o HLA-B27 pela técnica de CF, e 21,0% (n=13) por PCR. Isto resultou em uma especificidade de 38,5% para a CF. De todas as análises, 85,5% (n=53) obtiveram o mesmo resultado nas duas técnicas e nove 14,5% (n=9) tiveram resultados discordantes. O Valor Preditivo Positivo (VPP) da CF foi de 85,7% e o Valor Preditivo Negativo (VPN) de 83,5%. Dessa forma, a acurácia da CF foi de 85,5%. O coeficiente *Kappa*, utilizado para a determinação da concordância entre os testes foi de 0,454, considerando um  $p < 0,05$ .

## Discussão

Nessa amostra de pacientes brasileiros com EpA-ax, verificou-se uma concordância moderada (0,454), porém estatisticamente significativa, entre a CF e a PCR para a detecção do HLA-B27. Apesar disso, obtivemos uma boa acurácia onde apenas 9 em 62 resultados foram discordantes. Essas divergências, portanto, acabaram interferindo na precisão da CF e a literatura descreve bem a presença de resultados falsamente positivos ou negativos e cita o HLA-B7, como o principal interferente (16).

Verificamos que a CF demonstrou ser uma metodologia com elevada sensibilidade na detecção do HLA-B27. Nossa sensibilidade foi superior a demonstrada por Del Muñoz-Villanueva et. al, em 2000, e semelhante a relatada por Lingerfelter et al., em 1995 (26, 27). Essa variação das taxas de sensibilidade entre os estudos deve-se, muito provavelmente, a qualidade das amostras analisadas, uma vez que a metodologia de CF necessita de material contendo células viáveis e em quantidade satisfatória para ser processado. Seo et. al, em 2013, conseguiu obter uma sensibilidade de 100% ao trabalhar com as plaquetas do sangue dos seus pacientes (16).

A CF compartilha algumas limitações presentes em testes sorológicos, como o teste de Microlinfotoxicidade e o ELISA que, devido a presença de reações cruzadas com alelos do HLA-B27, necessitam ter seus resultados confirmados por técnicas de maior precisão e exatidão. Para preencher essa lacuna de especificidade, alternativamente, recomenda-se que a metodologia de CF utilize, pelo menos, dois anticorpos monoclonais anti-HLA-B27 diferentes (28).

A identificação do HLA-B27 é importante no diagnóstico da EA e a exclusão da sua presença reduz a probabilidade diagnóstica (29). A alta prevalência do marcador na população

que estudamos, 90,3%, corrobora os dados obtidos por Sampaio-Barros, et. al, em 2013, que verificou que a positividade do HLA-B27 nos pacientes espondilíticos pode variar entre 80% e 98%, sendo mais elevada em populações brancas não miscigenadas do norte da Europa. Verificamos também que 91,8% dos pacientes HLA-B27 soropositivos são autodeclarados caucasianos, o que está de acordo com a primeira revisão do consenso brasileiro de espondiloartropatias, de 2007 (7). Dentre as características clínicas da população estudada, a presença de doença periférica combinada com uma menor proporção de pacientes HLA-B27 positivos reforça o conceito de que este gene é marcador de acometimento axial (30).

A detecção correta do HLA-B27 auxilia o médico no diagnóstico da doença e a escolha do método a ser utilizado pode levar em conta, além de fatores como sensibilidade e especificidade, a disponibilidade do exame e o preço que ele custará para o paciente ou para o sistema de saúde, seja ele público ou privado. O aumento do conhecimento e acesso à informação possibilitou a incorporação da biologia molecular na rotina laboratorial. Apesar disso, sua implementação ainda não é uma realidade para os pequenos laboratórios. Técnicas como a de PCR, por exemplo, requerem área legalmente padronizada, equipe treinada, são trabalhosas e demandam de aparelhagem específica para serem executadas com qualidade. Todos esses fatores fazem com que muitos lugares não ofereçam esses tipos de exames e levam as empresas menores a optar por terceirizar o serviço. Existem alternativas para a diminuição desses problemas, como a produção de reagentes pelo próprio laboratório ou o acúmulo de amostras para serem processadas de uma só vez, afim de otimizar o uso de kits, por exemplo, mas todas incorrem em morosidade ou custos adicionais e tornam o teste pouco atrativo (11).

Por outro lado, a implementação de um citômetro de fluxo não necessita de espaço regulamentado, o manuseio do equipamento segue o manual do fabricante e a execução da técnica é realizada com base na bula do kit reagente. Apesar de suas limitações, novos



equipamentos surgem calcados sobre essas lacunas, com o intuito de reduzir o trabalho e manuseio da amostra ou para ampliar a sensibilidade e especificidade do equipamento aumentando o número de fluorocromos utilizados e de *lasers* do aparelho, por exemplo (31, 32).

A CF em nosso estudo apresentou alta sensibilidade para detecção do HLA-B27, porém baixa especificidade, o que torna sua aplicabilidade clínica limitada, quando comparada a técnica por PCR. Entretanto, por ser relativamente mais barata, menos trabalhosa e com obtenção de resultado em menor tempo do que a técnica por PCR, a CF poderia ainda ser considerada em determinadas situações como um teste de triagem capaz de ajudar o médico a excluir resultados falsamente negativos, racionalizando assim sua investigação laboratorial para diagnóstico da EA.

Nosso trabalho foi inovador ao relacionar o marcador HLA-B27 de pacientes com EpA-ax e a CF em uma população de pacientes brasileiros do sul do Brasil e sinaliza para a importância de se implementar na rotina uma metodologia de genotipagem para elucidar os casos falso positivos.

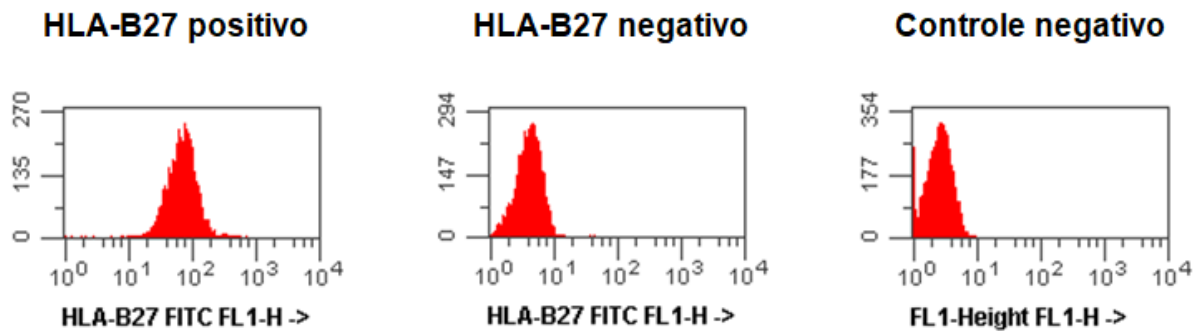
### **Declaração de Conflito de Interesses**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

### **Financiamento e Verbas**

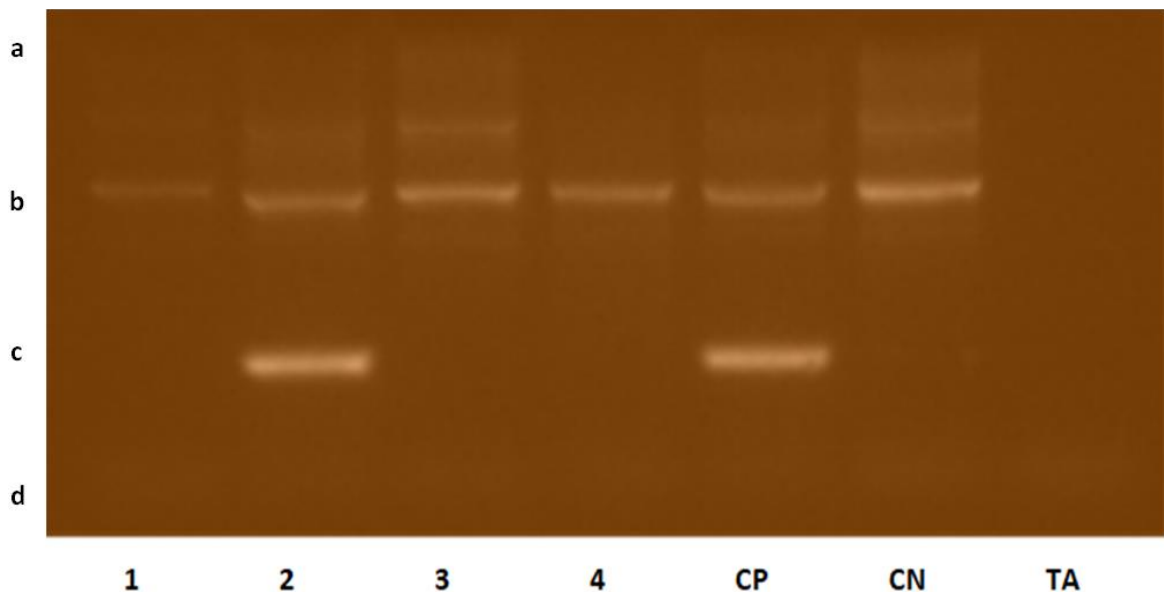
Esse trabalho contou com verba FIPE.

**Figura 1 :** Gráficos de expressão do marcador por Citometria de Fluxo<sup>a</sup>.

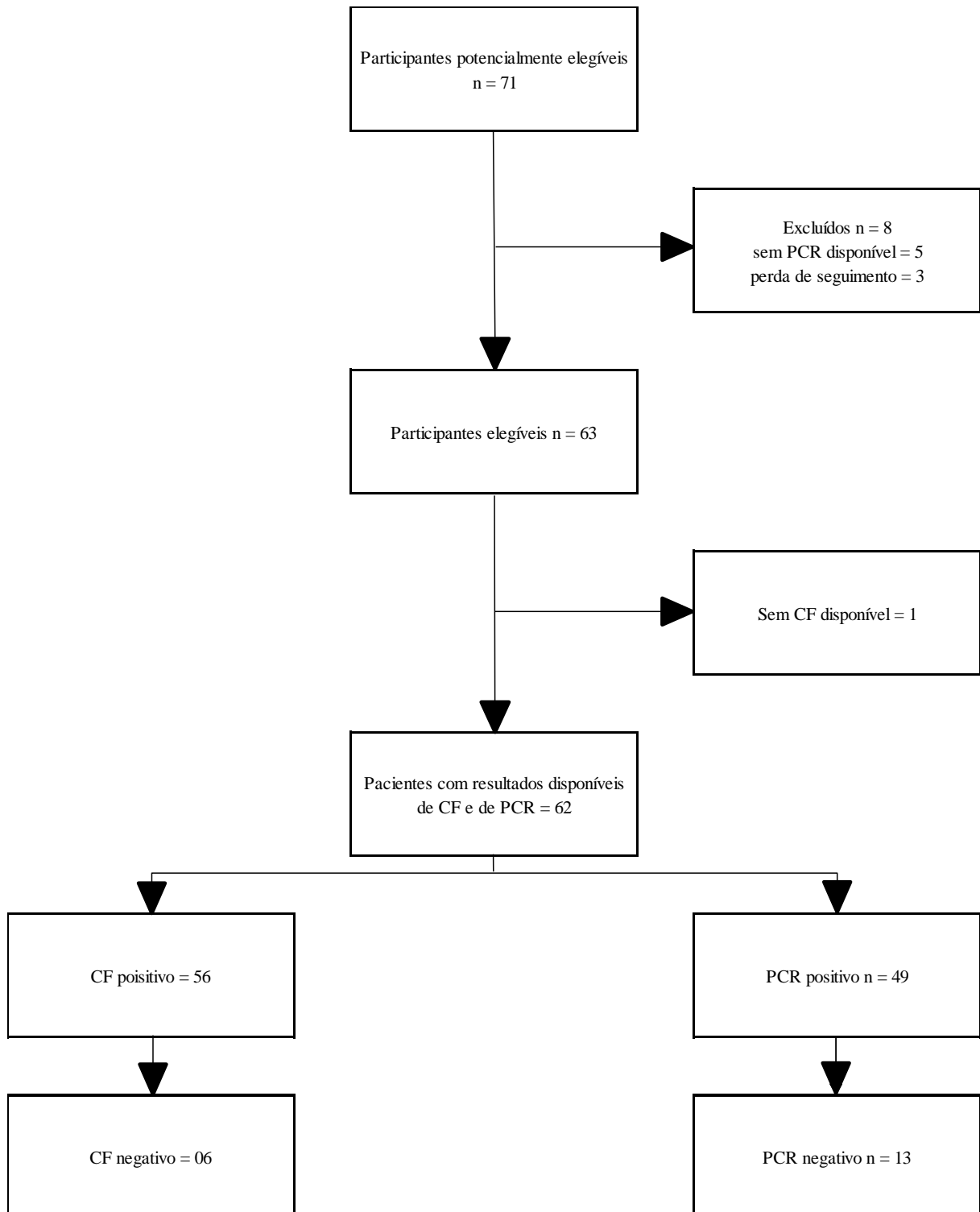


<sup>a</sup>O pico que se sobrepõe ao do controle negativo representa expressão negativa do marcador, enquanto picos à direita do pico do controle negativo representam expressão do marcador. Imagem proveniente do laboratório de apoio onde foram realizadas as análises. Imagem cedida pelo laboratório de apoio.

**Figura 2 :** Gel de agarose com brometo de etídeo revelado pós corrida eletroforética<sup>b</sup>.



<sup>b</sup>Resultados da genotipagem do HLA-B27 por PCR-SSP *in house* com fragmento amplificado de 150 pb. Linhas 1 – 4, pacientes; CN, controle negativo; CP, controle positivo; TA, tubo aberto (beta-hemoglobina); a, poço; b, banda de controle interno (796 pb); c, banda de tipagem positiva (150 pb); d, banda de primer.

**Figura 3** : Fluxograma de recrutamento e inclusão de participantes no estudo.

**Tabela 1:** Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população estudada de acordo com a presença de antígeno HLA27 por PCR

Características	n=62	HLA-B27		Valor P
		Positivo n=48	Negativo n=13	
Gênero masculino n (%) <sup>a</sup>	40 (64,5)	30 (62,5)	10 (76,9)	0,348
Caucasianos n (%)	55 (88,7)	45 (91,8)	10 (76,9)	0,153
Idade média em anos ( $\pm$ DP) <sup>b</sup>	54,5 $\pm$ 12,3	53,2 $\pm$ 12,5	59,5 $\pm$ 0,5	0,702
Mediana de tempo da doença em anos (IIQ 25,75) <sup>c</sup>	14,0 (9, 24)	13 (9, 21)	23 (11, 35)	0,069
Psoríase n (%)	3 (4,8)	2 (4,1)	1 (7,7)	0,513
Uveíte n (%)	25 (40,3)	18 (36,7)	7 (53,8)	0,344
Entesite n (%)	28 (45,2)	22 (44,9)	6 (46,2)	0,999
Artrite periférica n (%)	17 (27,4)	10 (20,4)	7 (53,8)	<b>0,032</b>
Dactilite n (%)	9 (14,5)	7 (14,3)	2 (15,4)	0,999
Sacroiliíte <sup>d</sup> n (%)	60 (96,8)	47 (95,9)	13 (100,0)	0,999

Abreviações: DP (Desvio Padrão), IIQ (Intervalo Inter Quartil)

<sup>a</sup>Teste de Chi-quadrado, n (%)

<sup>b</sup>Teste t de Student, media $\pm$ DP

<sup>c</sup>Teste de Mann-Whitney, mediana e IIQ

<sup>d</sup>Definida por radiologia convencional padrão

**Tabela 2:** Comparação entre os resultados do HLA-B27 das técnicas em *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e Citometria de Fluxo (CF)

		PCR		Total n (%)
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
CF	Negativo	5 (8,1%)	1 (1,6%)	6 (9,7%)
	Positivo	8 (12,9 %)	48 (77,4%)	56 (90,3%)
Total		13 (21,0%)	49 (79,0%)	62 (100,0%)

*Kappa*=0,454 (concordância moderada)

## Referências

## Referências

1. Moll JMH, Wright V: New York clinical criteria for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 32:354-363, 1973.
2. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009;68:777-83.
3. Ferreira ALM, Alvarenga CQM, Barcelos GF, Polito ETL. Espondilite Anquilosane. *Atualização em Reumatologia*. 2008; 48(4):243-247.
4. Sieper J, Braun J, M Rudwaleit, A Boonen, A Zink. Ankylosing spondylitis: an review. *Ann Rheum Dis* 2002;61(Suppl III):iii-88818.
5. Johns Hopkins Arthritis Center at Johns Hopkins Bayview Medical Center. Baltimore, Maryland 21224: Johns Hopkins University, updated August 28, 2017; accessed at 2017 nov 28. Available from: <https://www.hopkinsarthritis.org/arthritis-info/ankylosing-spondylitis/>
6. Feldtkeller E, Khan MA, Van der Heijde D, Van der Linden S, Braun J (2003). Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 23:61–66.

7. Sampaio-Barros PD, Azevedo VF, Bonfiglioli R, Campos WR, Carneiro SCS, Carvalho MAP, et al. Consenso Brasileiro de Espondiloartropatias: Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica Diagnóstico e Tratamento – Primeira Revisão. *Rev Bras Reumatol* 2007;47(4):233-242.
8. Sieper J, Braun J, Dougados M, Baeten D (2015). Axial spondyloarthritis. *Nature Reviews. Disease Primers*.v1:1-16.
9. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 301:904–907.
10. Gonzalez S, Martinez-Borra J, Lopez-Larrea C. Immunogenetics, HLA-B27 and spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11:257-64
11. Cho EH, Lee SG, Seok JH, Park BYN, Lee EH. Evaluation of Two Commercial HLA-B27 Real-Time PCR Kits. *Korean J Lab Med* 2009;29:589-93.
12. Darke C, Coates E. One-Tube HLAB27 /B2708 Typing by Flow Cytometry Using Two “Anti-HLA-B27” Monoclonal Antibody Reagents. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 78B:21–30 (2010).
13. Seipp MT, Erali M, Wies RL, Wittwer C. HLA-B27 Typing: Evaluation of an Allele-Specific PCR Melting Assay and Two Flow Cytometric Antigen Assays. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 63B:10–15 (2005).

14. Bonnaud G, Aupetit C, Preux PM, Cogné M, Drouet M. Optimisation of HLA-B27 Testing by Association of Flow Cytometry and DNA Typing. *Clin Rheumatol* (1999) 18:23–27.
15. Chou SJ, Lai NS, Su JP, Wu JL, Lan JL. Two color analysis of HLA-B27 antigen by flow cytometer--a comparative study by conventional microlymphocytotoxicity, DNA genotyping polymerase chain reaction and flow cytometric measurement. *J Clin Lab Anal.* 1997;11(6):369-73.
16. Seo BY, Won DII. Flow Cytometric Human Leukocyte Antigen-B27 Typing with Stored Samples for Batch Testing. *Annals of Laboratory Medicine* 2013;33:174-183.
17. Seipp MT, Erali M, Wies RL, Wittwer C. HLA-B27 typing: evaluation of an allele-specific PCR melting assay and two flow cytometric antigen assays. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;63:10-5.
18. College of American Pathologists. Survey 2011 B27-A HLA-B27 typing participant summary. Northfield: College of American Pathologists (<http://www.cap.org>), 2011:1-5.
19. Braun J, Davis J, Dougados M, et al.: First update of the international ASAS consensus statement for the use of anti-TNF agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 65:316-20, 2006.



20. Arlindo EM, Marcondes NA, Fernandes FB, Faulhaber GAM. Quantitative flow cytometric evaluation of CD200, CD123, CD43 and CD52 as a tool for the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2017;39(3):252-258.
21. CYTOGNOS: HLA-B27-FITC / HLA-B7-PE. Cytognos SL. Salamanca, SP, 2015. Bula do kit reagente HLA-B27 (Ref: CYT-COMB1012).
22. EXBIO I: Excellyse I 100 mL. EXBIO Praha, a.s. Vextec, CZ. Bula do kit reagente para lise de eritrócitos. Disponível em: [http://www.exbio.cz/products/accessory\\_reagent.py?idacc=ACC000000000000011](http://www.exbio.cz/products/accessory_reagent.py?idacc=ACC000000000000011). Acesso em: 29 nov 2017.
23. BD FACSCalibur. Becton, Dicson and Company. San Jose, CA, 2007. Instruções de uso do equipamento BD FACSCalibur.
24. BD CellQuest. Becton, Dicson and Company. San Jose, CA, 2007. BD CellQuest Pro Software Acquisition Tutorial 336484 Rev. A., version 5.
25. Landis JR, Koch GG. The measuring of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977 /mar;33(1):159-74.
26. [M.C. Del Muñoz-Villanueva](#), Muñoz E, [Veroz R](#), [Escudero A](#), [Collantes E](#). Differences in the recognition of HLA-B27 by microlymphocytotoxicity and flow

- cytometry. Determination of B27 subtypes in andalusian patients with spondiloarthropathies. *Revista Espanola de Reumatologia* 2000; 27:120-127.
27. Lingenfelter B, Fuller TC, Hunter J, Wittwer C. HLA-B27 Screening by Flow Cytometry. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*. 1995; 22:146-149.
28. Bonnaud G, Aupetit C, Preux PM, Conge M, Drouet M. Original Article Optimisation of HLA-B27 Testing by Association of Flow Cytometry and DNA Typing. *Clin Rheumatol* (1999) 18:23–27.
29. Sharma N, Sharma V, Masood T, Nautiyal SC, Sailwal S, Singh RK, Kushwaha RK, Singh RK. Usage of Conventional PCR Technology for the Detection of HLA-B27 Allele: A Significant Molecular Marker of Ankylosing Spondylitis. *Ind J Clin Biochem*. 2013; 28(2):189–192.
30. Hai L, Yi-Zhen G. Association of HLAB27 with AS and clinical features of the HLAB27-associated ankylosing spondylitis: a meta-analysis.
31. Aarsand AK, Johannessen HB, Scott CSEvaluation of a method for monoclonal antibody HLA-B27 analysis with the CELL-DYN Sapphire haematology analyser. *Int. International.Journal of Laboratory Hematology*. 2007; 29: 454-460.
32. Eissing N, Heger L, Baranska A, Cesnjevar R, Büttner-Herold M, Söder S, Hartmann A, Heidkamp GF, Dudziak D. Easy performance of 6-color confocal immunofluorescence with 4-laser line microscopes.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo verificou que as técnicas de PCR e de CF, para identificação do HLA-B27, tiveram uma taxa de correlação moderada. A técnica de CF, quando comparada com a PCR, apresentou alta sensibilidade porém baixa especificidade. Diante deste achado e considerando seu menor custo, maior rapidez para execução e relativa facilidade de acesso, poderia ser utilizada como teste de triagem, quando se busca identificar o HLA-B27 no processo de caracterização diagnóstica da EpA-ax. Sua baixa especificidade, no entanto, requer a utilização de um teste para confirmar os resultados positivos, devido, entre outras causas, a reação cruzada com o gene HLA-B7. Apesar da concordância com a técnica de referência, a CF poderia auxiliar na exclusão de resultados falsamente negativos, racionalizando assim a investigação laboratorial para o diagnóstico da EpA-ax.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A alta sensibilidade da técnica de CF na pesquisa do HLA-B27 incorre na presença de resultados falsamente positivos. Seria interessante sabermos quais são realmente os pacientes que apresentam esse gene. O sequenciamento genético poderia elucidar as dúvidas referentes aos casos discordantes, onde o resultado da CF foi diferente da encontrada pela PCR. Ainda mais, identificar quais os HLA apresentados ou quais subtipos de HLA-B27 presentes, traria informações relevantes, no sentido de que ainda não há pesquisa alguma que tenha se proposto a caracterizar o genótipo dessa população no sul do Brasil. A realização de um estudo mais amplo, contendo um tamanho amostral maior e com a presença de grupo controle poderia ser uma alternativa bastante válida na obtenção de preditores prognósticos que viriam a auxiliar na estratificação dos pacientes otimizando o potencial benefício do tratamento e minimizando seus riscos.

## 10 ANEXOS

### Anexo I. Termo de consentimento livre e esclarecido

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

##### **Estudo comparativo de duas técnicas laboratoriais para a determinação do HLA-B27 em pacientes com Espondilite Anquilosante**

#### **POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?**

Porque queremos comparar dois métodos de laboratório para detecção de um gene chamado HLA-B27, um gene presente em 80-90% dos pacientes com espondilite anquilosante. Queremos identificar qual das técnicas laboratoriais de detecção deste gene é mais precisa.

#### **DE QUE CONSTA O ESTUDO?**

Pessoas com espondilite anquilosante realizarão uma coleta de sangue e a presença do gene HLA B27 será pesquisada no sangue através de duas técnicas de laboratório chamadas citometria de fluxo e amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase.

Cada paciente realizará apenas uma coleta de 10 ml de sangue. A coleta será realizada no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e o paciente receberá o resultado assim que estes estiverem disponíveis.

#### **QUAIS SÃO AS VANTAGENS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?**

1. Você irá saber se é portador do gene HLA B27, uma informação que pode ajudar seu médico no acompanhamento e manejo de sua doença;
2. Você contribui para a construção do conhecimento que poderá trazer benefícios a outros pacientes com espondilite anquilosante

#### **QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?**

1. Comparecer ao hospital
2. Realizar uma coleta de sangue, um procedimento em geral simples, mas que pode causar dor, hematoma e sangramento no local de punção, bem como mal estar, tontura, suor e desmaios em raras ocasiões.

#### **HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?**

Não, este estudo consiste em apenas uma visita e coleta de sangue para cada paciente.

#### **DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE**

A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.

B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir a sua participação ou não.

C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal do paciente no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas, nem interfere na relação com seu médico assistente.

D. O paciente é livre para desistir a qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

**CUSTOS**

Você não terá nenhum custo para participar desta pesquisa.

Você receberá uma das vias deste termo de consentimento livre e esclarecido para levar para casa e outra via ficará com o investigador.

**COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO**

( ) Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, quero participar desta pesquisa e autorizo os pesquisadores a usarem os dados obtidos para análise.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Pesquisadores responsáveis:

Dr. Penélope Esther Palominos Telefone: (51) 3359 8340, (51) 9812 4446

Dr. Charles Lubianca Kohem Telefone: (51) 96780801

Comitê de Ética em Pesquisa Telefone: (51) 3359 8304

## Anexo II. Termo de confidencialidade para uso de dados

**Termo de Compromisso para Utilização de Dados**

Título do Projeto

	Cadastro no GPPG
--	------------------

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura

## Anexo III. Carta de aprovação do estudo pela comissão científica.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 120140

**Data da Versão do Projeto:**

**Pesquisadores:**

CHARLES LUBIANCA KOHEM

RICARDO MACHADO XAVIER

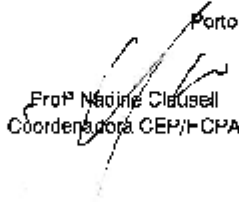
PENELOPE ESTHER PALOMINOS

**Título:** Estudo comparativo de duas técnicas laboratoriais para a determinação do HLA-B27 em pacientes com Espondilite Anquilosante

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 29 de novembro de 2012.

  
Profª Nádjia Clausell  
Coordenadora CEP/HCPA



## Anexo IV. Declaração STARD

Section & Topic	No	Item	Reported on page #
<b>TITLE OR ABSTRACT</b>			
	<b>1</b>	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	<b>50</b>
<b>ABSTRACT</b>			
	<b>2</b>	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)	<b>50</b>
<b>INTRODUCTION</b>			
	<b>3</b>	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	<b>50</b>
	<b>4</b>	Study objectives and hypotheses	<b>50</b>
<b>METHODS</b>			
<i>Study design</i>	<b>5</b>	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)	<b>50</b>
<i>Participants</i>	<b>6</b>	Eligibility criteria	<b>53</b>
	<b>7</b>	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	<b>53</b>
	<b>8</b>	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	<b>53</b>
	<b>9</b>	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	<b>53</b>
<i>Test methods</i>	<b>10a</b>	Index test, in sufficient detail to allow replication	<b>54-55</b>

	<b>10b</b>	Reference standard, in sufficient detail to allow replication	<b>55-56</b>
	<b>11</b>	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	-
	<b>12a</b>	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory	-
	<b>12b</b>	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory	-
	<b>13a</b>	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test	-
	<b>13b</b>	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard	<b>56</b>
<i>Analysis</i>	<b>14</b>	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	<b>56</b>
	<b>15</b>	How indeterminate index test or reference standard results were handled	-
	<b>16</b>	How missing data on the index test and reference standard were handled	-
	<b>17</b>	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	-
	<b>18</b>	Intended sample size and how it was determined	-
<b>RESULTS</b>			
<i>Participants</i>	<b>19</b>	Flow of participants, using a diagram	<b>57</b>
	<b>20</b>	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	<b>57</b>
	<b>21a</b>	Distribution of severity of disease in those with the target condition	-
	<b>21b</b>	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition	-
	<b>22</b>	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	-
<i>Test results</i>	<b>23</b>	Cross tabulation of the index test results (or their distribution)	<b>57</b>

		by the results of the reference standard	
	<b>24</b>	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	<b>57</b>
	<b>25</b>	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	-
<b>DISCUSSION</b>			
	<b>26</b>	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability	<b>58</b>
	<b>27</b>	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	<b>58</b>
<b>OTHER INFORMATION</b>			
	<b>28</b>	Registration number and name of registry	<b>74</b>
	<b>29</b>	Where the full study protocol can be accessed	-
	<b>30</b>	Sources of funding and other support; role of funders	-

---