

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
MÉDICAS:

ENDOCRINOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

VALIDAÇÃO DA TRIAGEM DE MACROPROLACTINEMIA
UTILIZANDO PRECIPITAÇÃO COM POLIETILENOGLICOL
E
ENSAIO QUIMIOLUMINESCENTE

AUTOR: CLAUDIO E. F. NUNES PEREIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. MAURO ANTONIO
CZEPIELEWSKI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROGÉRIO FRIEDMAN

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Médicas: Endocrinologia,
para obtenção do título de Mestre.

PORTO ALEGRE

2005

P436v Pereira, Cláudio E. F. Nunes

Validação da triagem de macroprolactinemia sérica utilizando precipitação com polietilenoglicol e ensaio quimioluminescente. / Cláudio E. F. Nunes Pereira — Porto Alegre: UFRGS, 2005.

61p.

Dissertação(Mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, 2005.

1. Ciências Médicas. 2. Análise e diagnósticos. 3. Macroprolactina. 4. Hiperprolactinemia. 5. Ensaio Quimioluminescente. I. Título.

CDU: 616-071

Catálogo na fonte: Cátia Rosana Lemos de Araújo – CRB 10/1451
Biblioteca Central / UNICRUZ

Agradecimentos:

A meu pai e minha mãe,
Meus irmãos,
Aos meus orientadores, Dr. Mauro C. e Dr. Rogério F.,
Ao bioquímico J. R. Jesus,
Ao meu colega e amigo G.A. F. S. Rollin,
A meus antigos professores.

SUMÁRIO:

SUMÁRIO:	4
ABREVIATURAS:	5
1. REVISÃO DA LITERATURA	6
1.1. PROLACTINA	6
1.2. HIPERPROLACTINEMIA:	9
1.3 MACROPROLACTINA:	15
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	20
2. OBJETIVO	24
3. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS	25
Validação do ensaio imunoquimioluminescente DPC Immulite de prolactina sérica com o teste de precipitação com polietilenoglicol na triagem de macroprolactinemia.	25
4. Artigo Original em inglês.	37
Validating the DPC Immulite chemiluminescent immunoassay serum prolactin for use with the PEG precipitation test for macroprolactinemia screening.	37
5. REFERÊNCIAS DOS ARTIGOS:	48
6. ANEXOS	51
ANEXOS I. COMPARAÇÃO IMMULITE E DELFIA.	51
ANEXOS II. TIPOS DE PRL NA CROMATOGRÁFIA.	54
ANEXO III. RESULTADOS DE CONTROLE EXTERNO, IMMULITE E AUTODELFIA.	55
ANEXOS IV. RESULTADOS DE SOROS SUBMETIDOS A CROMATOGRÁFIA (CFG).	59

ABREVIATURAS:

Anti-PRL- Anticorpos anti-PRL
ASC- Área sob a curva obtida através da CFG.
bPRL- Prolactina Big ou dimérica.
bbPRL ou MacroPRL- macroprolactina.
CFG- Cromatografia por filtração em Gel.
E2- Estradiol
GH- Hormônio do Crescimento
GnRH- Hormônio liberador das gonadotrofinas
HiperPRL- hiperprolactinemia
IFMA- Ensaio imunofluorimétrico
IgG- Imunoglobulina
IGF-1. Insulin-like Growth Factor 1.
IQL- Ensaio imunoquimioluminescente
kDa - Kilodaltons
mPRL- Prolactina Little ou monomérica.
P- Progesterona
PEG- Solução de polietilenoglicol
PRL não-Macro- estimativa da porcentagem de PRL não correspondente a macroPRL(mPRL+bPRL)
PRL- Prolactina
RIE- Radioimunoensaio
ROC- Receiver Operator Curve.
TRH- Hormônio liberador da Tireotrofina.
VIP- Peptídeo vasoativo intestinal
% R de PRL- porcentagem de recuperação de PRL após precipitação com PEG.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. PROLACTINA

A prolactina (PRL) humana é um hormônio polipeptídico secretado, sob controle hipotalâmico, pelas células lactotróficas da hipófise anterior. Sua estrutura básica é composta de um peptídeo linear com 199 aminoácidos pesando 23 kDa que se assemelha ao hormônio do crescimento(GH) e ao lactogênio placentário humano(hPL).(Sinha 1995, Smith & Norman, 1990).

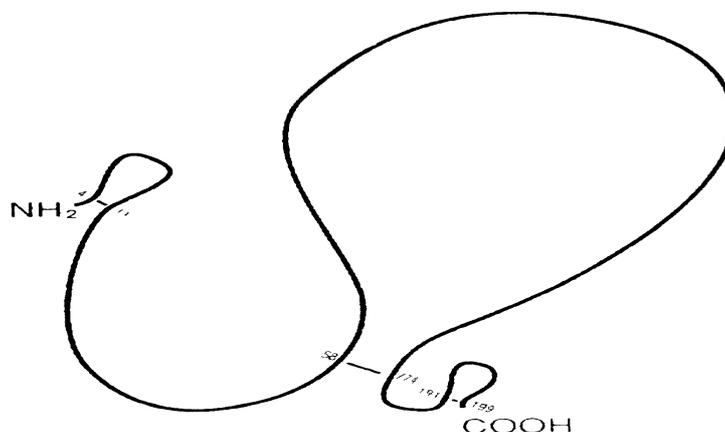


Figura 1: Molécula de PRL monomérica(Adaptado de Smith & Norman, 1990)

Atualmente sabe-se que na circulação humana podem ser identificados, através da cromatografia por filtração em gel, 3 formas principais, quais sejam:

- a) Little(peso molecular de 23 kDa) ou monomérica – mPRL;
- b) Big(peso molecular de 45 a 50 kDa) ou forma dimérica- bPRL, e;
- c) Big-Big(peso molecular superior a 100 kDa), bbPRL ou macroprolactina(macroPRL).

Tabela 1: Formas de PRL. Principais formas de PRL no soro.

Variantes	Peso (kDa)	Comentários
PRL monomérica	23	Principal componente das preparações de referência de PRL, mas apenas 30% do nível sérico no estado basal.
PRL Glicosilada (G-PRL)	25	Maior componente do soro no estado basal.
Big PRL	50-60	Reduzido em estados hiperprolactinêmicos. Predominantemente dímeros. <20% da PRL sérica.
Big-Big PRL (macroPRL)	>100	Agregados. < 5% PRL sérica.

* Adaptado de Smith & Norman, 1990.

No soro das pessoas normais, a principal forma presente é a mPRL, perfazendo cerca de 85 a 90 % do total, com valores pequenos de bPRL e macroPRL(Smith & Norman, 1990). Estas três principais formas são identificadas no exame de Cromatografia por Filtração em Gel.(Ver Fig. 2).

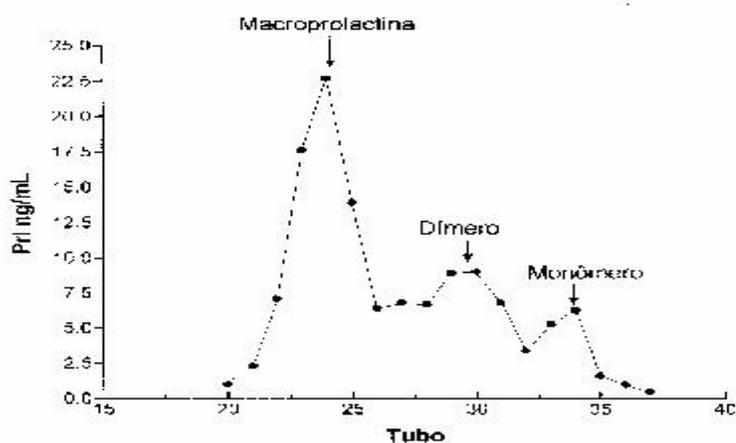


Figura 2: Cromatografia com filtração em gel evidenciando três picos principais das moléculas de PRL. Adaptado de Glezer et al, 2001.

Além dessas formas secretadas na hipófise, há alterações tissulares, que dão origem a diversas outras formas que podem ser encontradas no sangue periférico, tais quais: formas clivadas, glicosiladas, fosforiladas, além das formas ligadas a imunoglobulinas (IgG).

A secreção da prolactina pelos lactotrófos hipofisários é controlada pelo hipotálamo. No seu controle, sabe-se que o tônus maior sobre essas células é exercido pela Dopamina, que têm efeito inibitório sobre sua secreção. A Dopamina é secretada nas células túbero-infundibulares do núcleo arqueado do hipotálamo e é levada até a hipófise anterior através da haste hipofisária, pelos vasos hipotálamo-hipofisários. Chegando na hipófise anterior, liga-se aos receptores de Dopamina (D2) onde exerce seu efeito inibitório, tanto sobre a síntese quanto sobre a secreção de prolactina. Sabe-se também que há estímulos hormonais liberadores, assim, o tônus final depende de uma complexa interação de hormônios em nível do eixo hipotálamo-hipofisário. Entre esses hormônios, inclui-se: hormônios liberadores da tireotrofina (TRH), das gonadotrofinas (GnRH) e peptídeo vasoativo intestinal (VIP) (Molitch, 1992).

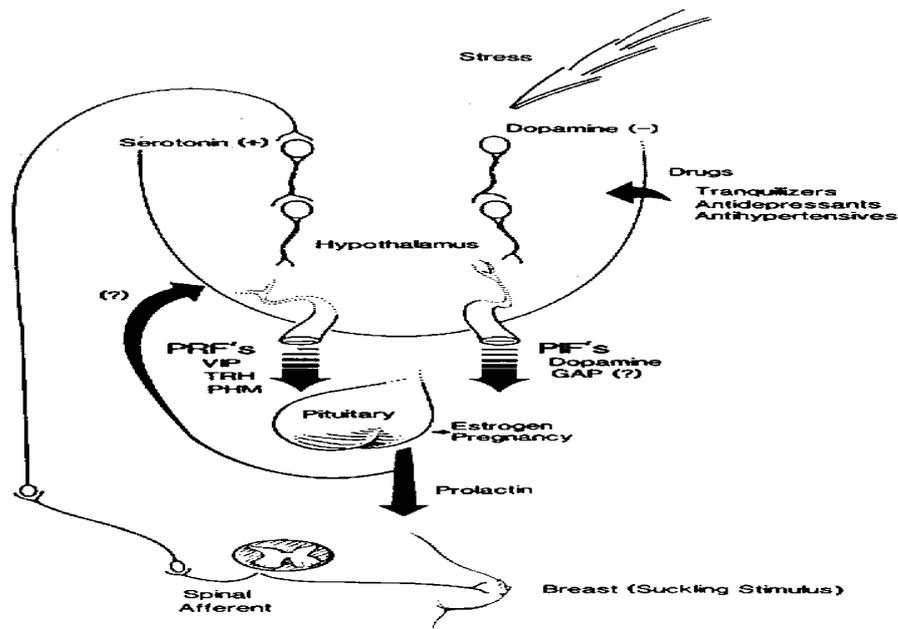


Figura 3: Controle da secreção de PRL hipofisária. Adaptado de Molitch ME., 2002.

A secreção da prolactina é pulsátil, sendo secretada mais freqüentemente durante o sono e no pós-prandial. Alguns estímulos levam a seu aumento sérico. A estimulação das mamas, como ocorre na amamentação, através de um arco reflexo neural espinhal, causa liberação de hormônios estimuladores de PRL pelo hipotálamo. Os estrógenos, aumentados na gravidez, exercem um efeito positivo sobre a síntese e produção de PRL, preparando a mama para a amamentação no final da gestação.

Além destas situações, a PRL pode também aumentar significativamente após situações de estresse, o que causa resultados falsamente elevados. Alguns estímulos farmacológicos também aumentam a PRL. Dentre esses, poderia se comentar o TRH e a Metoclopramida(Molitch, 2002).

A principal função da PRL é estimular a lactogênese durante o período gestacional e puerpério. No desenvolvimento da mama, a PRL age nos ductos acinares diferenciados para produzir leite. Os receptores de PRL aumentam("up-regulated") pelo estradiol. Para a função de produção de leite, é necessário uma mama desenvolvida, o que só é possível numa maturação normal com a ação de estrógenos e progesterona, que ocorre no lactente e, principalmente, na puberdade feminina. Sabe-se também da existência de hormônios permissivos como o GH, IGF-1, Insulina e Cortisol, sem os quais os três hormônios, antes citados, são menos ativos.

Além da produção de leite, a PRL é importante na manutenção da massa óssea, sendo seu efeito isolado, mas potencializado na deficiência de andrógenos e estrógenos. Ainda, sabe-se que ela tem efeito imunomodulador e é importante na esterilidade e infertilidade(Vance & Thorner, 1995).

1.2. HIPERPROLACTINEMIA:

A hiperprolactinemia tem especial importância na avaliação de distúrbios menstruais, esterilidade feminina e masculina, impotência e galactorréia. Além disto, sua medida é básica na avaliação de tumores

hipofisários, sendo, mais especificamente, o marcador do diagnóstico e seguimento dos prolactinomas. Em função destas indicações, é hoje exame dos mais solicitados aos laboratórios clínicos que atuam na área de Endocrinologia, Ginecologia e Reprodução.

A hiperprolactinemia patológica é definida como a PRL consistentemente acima de 20 ng/mL(700 mU/L) em adulto, na ausência de gestação e lactação pós-parto. Na gestação, a prolactina aumenta progressivamente, desde o primeiro trimestre até quase 400 ng/mL no final do terceiro trimestre. Os recém nascidos, até a sexta semana de vida, podem apresentar até 300 ng/mL(Vance & Thorner, 1995).

Entre as causas de hiperprolactinemia patológica, encontra-se: qualquer patologia que interfira na síntese de Dopamina, seu transporte para a hipófise ou sua ação nos receptores dopaminérgicos dos lactotrófos(Tabela 2):

Tabela 2: Causas de hiperprolactinemia

1. Desordens da Hipófise(Prolactinomas, Acromegalia, Síndrome da sela vazia, Hipofisite Linfocítica, Doença de Cushing)
2. Hipotálamo(Craniofaringioma, meningioma, disgerminomas, outros tumores, Sarcoidose, Histiocitose X , secção do eixo hipófise-hipotalâmico)
3. Estímulo neural(Estimulação do mamilo, trauma da parede torácica ou cirurgia, Herpes Zoster torácico)
4. Medicamentos(Fenotiazinas, Haloperidol, drogas IMAO, antidepressivos tricíclicos, Reserpina, Alfametildopa, Metoclopramida, Sulpirida, Estrógeno, Cocaína, ACO)
5. Causas miscelâneas(gravidez, Hipotireoidismo 1^o , Insuficiência renal crônica, cirrose, insuficiência supra-renal 1^a , Síndrome dos Ovários Policísticos)
6. Hiperprolactinemia idiopática macroprolactinemia*

Adaptado de Molitch ME, 2002.

* causa ainda não totalmente elucidada.

Dentre as manifestações clínicas provenientes da hiperprolactinemia, destacam-se os distúrbios na função menstrual(amenorréia ou oligoamenoréia) e galactorréia(secreção excessiva ou espontânea de leite) na mulher, e hipogonadismo no homem com diminuição da libido, impotência sexual, até infertilidade. Os homens podem apresentar ginecomastia, mas raramente tem galactorréia. Sabe-se que a PRL é fundamental também para a manutenção da densidade mineral óssea e, portanto, a hiperprolactinemia continuada, no longo prazo, pode levar a osteoporose tanto em mulheres quanto em homens. Isso, particularmente, se acentua nos casos de mulheres com menopausa precoce e, em ambos sexos, na presença de hipoandrogenismo. Adicionalmente, podem ser observados sintomas decorrentes do efeito da massa tumoral, nos casos de macroadenomas, como hipopituitarismo, cefaléia e alterações visuais(Vance & Thorner, 1995).

Dentre as causas citadas de hiperprolactinemia, na prática clínica inicialmente devemos excluir a mais prevalente, ou seja, o uso de drogas. Dentre estas, cabe ressaltar: neurolépticos, alguns antidepressivos ou anti-hipertensivos, estrógenos, e bloqueadores dos receptores dopaminérgicos como a Metoclopramida e a Domperidona. Em geral, considera-se que o uso de drogas determine hiperprolactinemia leve a moderada(< 100 ng/mL)(Villar et al, 2003; Vance & Thorner, 1995).

Após a anamnese com determinação da sintomatologia do paciente e exclusão de uso de drogas, é fundamental, prosseguindo a investigação, a medida de TSH para excluir hipotireoidismo primário e de creatinina, para excluir IRC, causas bem prevalentes. Em alguns casos, principalmente em valores altos de PRL(> 100 ng/mL) ou na presença de sintomas decorrentes do efeito da massa tumoral, exames de imagem como Rx de sela túrcica, TC e RM de hipófise com gadolínio, são indicados. Nos casos em que haja redução de libido, dosar hormônios sexuais. Na presença de macroadenoma(tumor > 1 cm), selar ou paraselar, dosar todos os hormônios hipofisários.

Após descartar o uso de drogas, deve-se afastar a possibilidade de Macroprolactinemia, a presença da variante de alto peso molecular. Sabe-se que ela pode corresponder à cerca de 15-25% dos casos de hiperprolactinemia e então se preconiza o teste de precipitação com PEG para sua triagem em todos soros hiperprolactinêmicos(Glezer et al 2001; Olukoga & Kane, 1999). A Macroprolactinemia determina hiperprolactinemia leve a moderada, podendo, inclusive, apresentar níveis mais elevados, levando a dificuldade na diferenciação com tumor hipofisário(Hauache et al, 2002; Rebbeca et al, 1985)

Excluídos os casos anteriores, passa-se a considerar a possibilidade de adenomas hipofisários produtores de PRL, ou prolactinomas. Estes são tumores selares muito comuns, estando entre os tumores cranianos mais freqüentes. É estimada sua presença na ordem de 400 mulheres em idade fértil em 100.000(0,4%). Merece consideração o termo “incidentaloma” de hipófise. É a imagem compatível com tumor hipofisário detectada, acidentalmente, por tomografia computadorizada(TC) ou RM da região selar. Estima-se a freqüência de microincidentalomas na população geral é de até 25% por análise de autópsias e em torno de 10% quando se realiza a RM(Glezer et al, 2001, Aron et al 2000; Molitch, 1997; Chediak & Aron 1997).

Os pacientes com Prolactinoma tem níveis séricos de prolactina mais altos, geralmente maiores que 100 ng/mL e, não raro, maiores que 200 ng/mL(cerca de 45% dos casos). Como regra geral, normalmente há uma correlação entre nível sérico de prolactina e tamanho do tumor(Villar et al, 2003; Molitch, 1992).

A presença de sintomas como hipopituitarismo, cefaléia e alterações visuais é sugestivo de presença de macroadenoma(tumor > 10 mm) ou de qualquer outro tumor para-selar com efeito de massa(compressão da haste ou tecido hipofisário). Cabe aqui ressaltar que os tumores encontrados em homens e mulheres pós-menopausa tendem a serem maiores, pois o crescimento tumoral clinicamente inaparente leva a retardo em seu diagnóstico enquanto na mulher pré-menopáusia, a

presença de alteração menstrual e galactorréia levam a diagnóstico mais precoce(Glezer et al, 2001; Vance & Thorner, 1995).

Ainda, tumores extra e para-selares que comprimam a haste hipofisária podem também ser a causa da hiperprolactinemia. Entre eles: tumores de células germinativas, tumores de resquícios embrionários(Craniofaringioma), granulomas, gliomas, lesões infecciosas, lesões inflamatórias, aneurismas, metástases, etc. Nesse caso, a secreção de PRL é dependente da inibição de Dopamina e, assim, os níveis séricos são geralmente menores que 100 ng/mL(Villar, 2003).

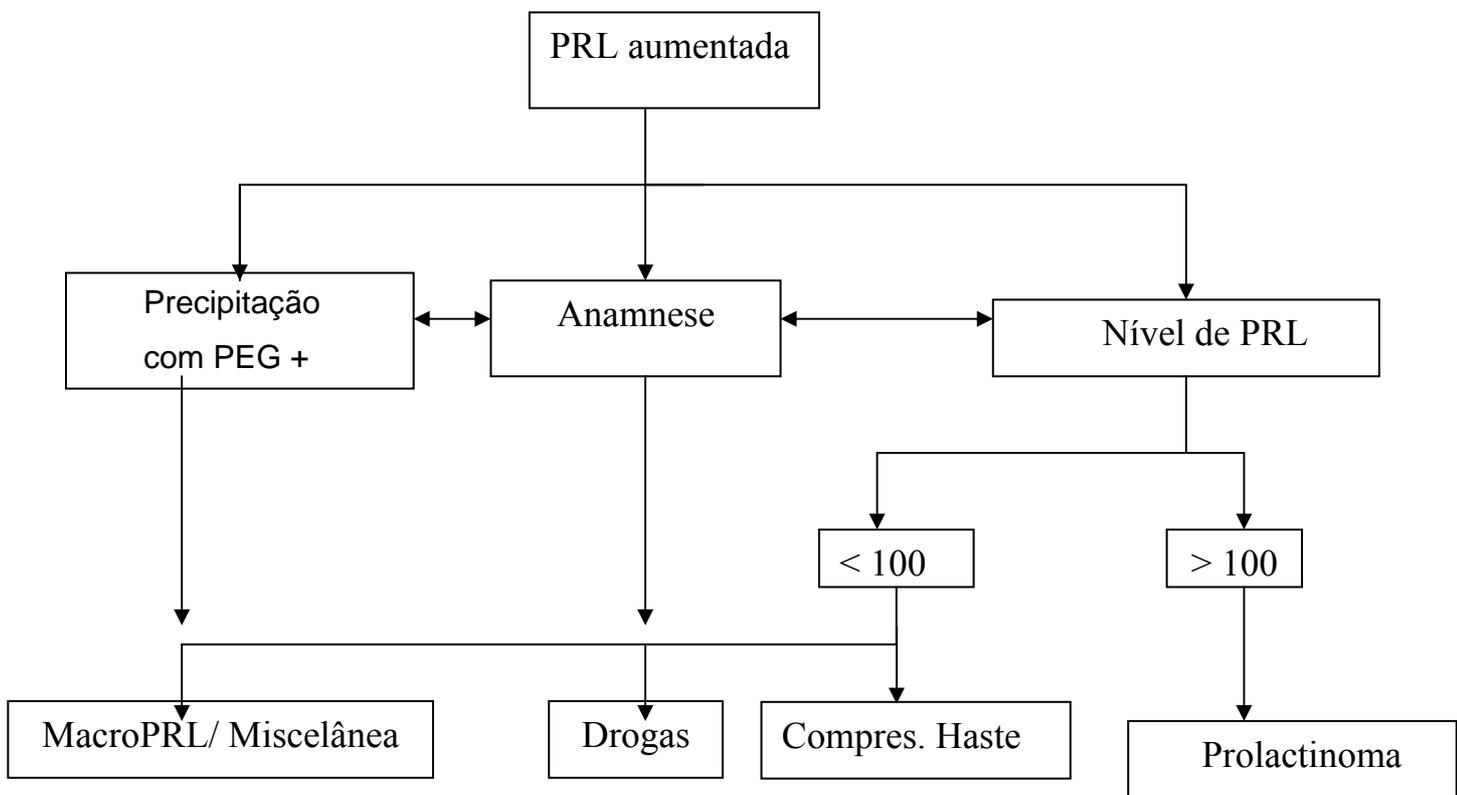


Figura 4: Investigação de hiperprolactinemia.

No que diz respeito ao diagnóstico diferencial, deve-se considerar ainda algumas armadilhas diagnósticas radiológicas, entre as quais desvio de haste hipofisária, presente em cerca de 13% das pessoas normais e presença de um septo assimétrico ou artefatos, como “clips” e próteses, que podem dificultar a interpretação do exame. Estas armadilhas podem sugerir o diagnóstico falso de microadenoma. Além

disso, pode haver o aumento global da hipófise em situações fisiológicas, como puberdade, depressão, e gestação(Glezer et al, 2001).

Existem também duas situações bioquímicas que podem causar dificuldade diagnóstica: Estresse e efeito gancho(Hook). O estresse pode levar a aumentos significativos dos níveis basais de prolactina. Este é um fenômeno raro(menos de 0,5 % das pacientes), porém de importância prática evidente. Geralmente os valores são baixos(menores que 40 ng/mL) e ocorre em pacientes onde a coleta não foi feita após o repouso. Como hoje a dosagem de PRL em pool de três amostras raramente é feita de rotina devido a limitações de custo-benefício, pode ser necessário a repetição do exame após repouso de 30 minutos e de duas horas do despertar do paciente, nos casos em que a PRL inicial foi pouco aumentada(Glezer et al, 2001).

O chamado fenômeno do “gancho”, ocorre em concentrações de PRL muito elevadas(na ordem de 1.000 a 10.000 vezes o normal, fato que pode ocorrer em alguns prolactinomas). O nível de PRL bloqueia simultaneamente os anticorpos de captura e revelação do ensaio imunométrico, levando a resultados falsamente baixos. Nesse caso, a dosagem deverá ser repetida com uma diluição conveniente ou com a realização de ensaio em duas fases(Villar et al, 2003; Glezer et al, 2001).

Ainda, os casos de hiperprolactinemia em que não se encontrou nenhuma causa, são chamados de idiopáticos. Estudos atuais demonstram que vários casos classificados anteriormente como idiopáticos, podem estar na verdade associados a Macroprolactinemia(Vance & Thorner, 1995).

Por fim, além de todas as considerações diagnósticas e clínicas já referidas, há uma dificuldade na medida da PRL sérica que depende do ensaio utilizado. Como consequência das três formas moleculares existentes de prolactina, há uma diferença na sua medida sérica quando da presença da molécula de alto peso molecular entre os diferentes

imunoensaios existentes. Isso pode ainda causar dificuldade diagnóstica que será motivo de consideração a seguir.

1.3 MACROPROLACTINA:

Em decorrência de causas ainda não determinadas, em alguns indivíduos o soro contém maior quantidade de macroPRL, condição denominada de Macroprolactinemia. Em casuísticas recentes, a Macroprolactinemia representa uma causa comum de hiperprolactinemia, com uma prevalência variando de 8 a 26%, conforme a série analisada(Vieira, 2002; Olukoga & Kane, 1999). Cattaneo et al, em 2001, com base em vários estudos abrangendo 1430 pacientes, acharam que um em cada 5 pacientes são macroprolactinêmicos. Classicamente, a Macroprolactinemia foi relacionada a mulheres com hiperprolactinemia associada a ciclos menstruais regulares, fertilidade preservada e ausência de lesão hipofisária na TC ou RM(Fraser et al, 1989; Jackson et al, 1985; Rebecca et al, 1985).

A ausência de sintomas se deveria a redução da bioatividade da macroPRL, mas alguns estudos sugerem que a macroPRL possa ter bioatividade normal ou até aumentada(Carlson et al, 1992; Leite et al, 1992). Em concordância com esses achados, Olukoga e Kane(1999) e Leite e cols(1992) observaram em suas séries de pacientes com Macroprolactinemia, um número significativo de mulheres com pelo menos um sintoma de hiperprolactinemia, sugerindo que esta condição clínica pode não ser tão benigna quanto se imaginava, e que deve ser pesquisada também em mulheres sintomáticas.

Em homens, Wortsman e cols(1989; Am J Med) relataram dois casos com hiperprolactinemia cuja função gonadal estava preservada, e na realidade tratavam-se de dois casos de Macroprolactinemia.

Na maior revisão de pacientes até o momento(Vallete-Kasic et al, 2002), foram analisados 106 pacientes com macroprolactinemia, sendo 96 adultos masculinos, 6 homens e 4 crianças. Nesses pacientes, encontrou-se a presença de galactorréia em 46 % dos casos, distúrbios

menstruais em 39%, galactorréia mais distúrbios menstruais em apenas 12% e fertilidade preservada em 68% dos casos. A PRL média foi 61 µg/L+/- 66,3. Essa revisão nos aponta para o fato de que a macroPRL pode ser sintomática também.

Em geral, os casos de macroPRL apresentam um nível de PRL com aumento de leve a moderado, mas em alguns casos, a Macroprolactinemia pode simular um tumor pituitário devido aos altos níveis de prolactina(Hauache et al, 2002; Rebecca et al, 1985). Além disso, ela pode ser associada a qualquer outra causa de hiperPRL, inclusive podendo estar presente um adenoma hipofisário associado.

A etiologia exata da macroprolactina ainda está por ser totalmente elucidada, já tendo sido encontradas formas com auto-anticorpos anti-PRL(Vieira 2002; Leite et al, 1992), sendo que nestes casos, os altos níveis de PRL sérica estariam associados a redução de seu “clearance” sangüíneo.

Vários estudos sugerem que a principal forma de macroPRL é a associação PRL- auto-anticorpos anti-PRL(Hattori, 1996; Leite et al, 1992). Também foram encontrados agregados de mPRL ligados de forma covalente e não-covalente(Hattori, 1996) e casos de formas glicosiladas de PRL(Carlson et al, 1992). Alguns estudos sugeriram a transmissão familiar da Macroprolactinemia em familiares de primeiro grau(Bonhoff et al, 1995; Larrea et al, 1989), fato não confirmado por outros autores, pelo menos, na maioria dos casos(Leite et al, 1992). Também houve relatos de sua associação com doença auto-imune da tireóide(Vallete-Kasic et al, 2002; Malarkey et al, 1988).

Os casos em que se encontrou um adenoma hipofisário com a presença de macroPRL, levantaram a possibilidade da existência de formas de macroPRL produzidas centralmente, na hipófise. Recentemente, Mounier et al(2003), retomou essa hipótese, ao estudar 13 casos de hiperPRL associada a adenoma hipofisário. Eles encontraram 5 casos entre estes, totalizando 40% do total. Esse achado vem a corroborar o encontrado por Ohnami et al(1987) que estudou a semelhança entre os resultados cromatográficos de extratos hipofisários

e de sangue periférico em 8 pacientes, concluindo que essa forma anômala pode ser secretada centralmente. Nesses casos com presença de tumor hipofisário, os níveis séricos de PRL são elevados, assim como havia presença sintomática em todos casos, o que facilita no seu diagnóstico diferencial(Mounier et al, 2003).

Finalizando, para suspeitar-se da presença de macroPRL, é uma pista importante a presença de dados clínicos, biológicos ou de seguimento discrepantes, tais quais:

- 1) Hiperprolactinemia sem disfunção gonadal;
- 2) Casos que outrora seriam classificados como hiperPRL idiopática, por inexistência de outra possível causa a ser atribuída, e ;
- 3) Falta de normalização do nível de PRL apesar de tratamento médico ou cirúrgico adequado(Vallete-Kasic et al, 2002).

Além disso, diante da alta prevalência do achado nos casos de hiperprolactinemia, assim como a possível associação de mais de uma etiologia para justificar a hiperprolactinemia, se preconiza a realização da sua triagem com PEG universalmente.

O teste padrão para a detecção da macroprolactina é a cromatografia por filtração em gel. Porém, o teste baseado na precipitação com polietilenoglicol(PEG) é mais simples e barato, tendo sido validado por Olukoga e Kane(1999). Como já foi referido no parágrafo sobre heterogeneidade da molécula de prolactina, todos os métodos de dosagem de PRL apresentam um grau de reatividade cruzada com a macroPRL. Assim, o valor resultante do teste de precipitação com PEG depende do ensaio utilizado.

Uma tentativa de estudar a interação dos diferentes ensaios com a macroPRL foi realizado a partir do esforço do UKNEQAS(United Kingdom National External Quality Assessment Scheme). Ele permitiu dividir os diversos ensaios em três categorias de reatividade com a macroPRL: alta, média e baixa(Smith et al, 2002; Gilson G et al, 2001; John R [Letter] 2000).

Assim, é importante, quando da solicitação de determinado exame de PRL, saber se o ensaio utilizado interfere ou não com a forma anômala da molécula. Originalmente, o teste de triagem de macroPRL utilizando precipitação com PEG foi validado para o teste imunofluorimétrico Delfia. Devido à interferência com a macroPRL já citada, seu resultado não deve ser extrapolado sem adaptações para os demais ensaios, devendo antes, ser validado com o novo ensaio. Como demonstrado em outros estudos, o ensaio imunoquimioluminescente Immulite tem interação positiva com o PEG, ou seja, dá valores de PRL mais altos que os esperados na presença de macroPRL. Já o método Delfia tem interação negativa(Gilson G et al 2001).

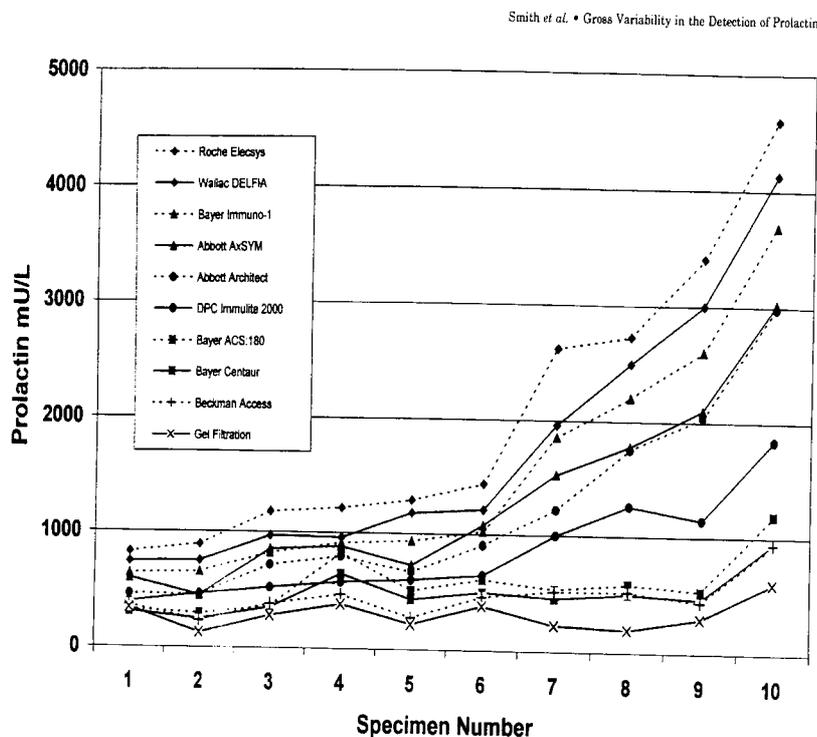


Figura 5: Dosagens de PRL em diferentes imunoensaios. Adaptado de Smith et al, 2002.

No que concerne ao tratamento da macroPRL, sabe-se que a mPRL, em geral, decresce com o tratamento com agonista

dopaminérgico, mas nem sempre normaliza, o que só ocorre em encontraram 47 % dos casos(Vallete-Kasic et al , 2002).

Diante do exposto, nosso propósito foi validar o teste de precipitação com PEG usando o ensaio imunoquimioluminescente DPC Immulite, aquele usado na rotina de nosso hospital.

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Aron DC, Hewiett TA. (2000) Pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 29:205-21.

Bonhoff A, Vuille JC, Gomez F, Gellersen B. (1995) Identification of macroprolactin in a patient with asymptomatic hyperprolactinaemia as a stable PRL-IgG complex. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 103:252-255.

Carlson HE, Markoff E, Lee DW. (1992) On the nature of serum prolactin in two patients with macroprolactinemia. *Fertility and Sterility* 86(1): 78-87.

Cattaneo F, Kappeler D, Muller B. (2001) Macroprolactinaemia, the major unknown in the differential diagnosis of hyperprolactinaemia. *Swiss Med Weekly* 131: 122-126.

Chediak RM, Aron DC. Incidentalomas. (1997) A disease of modern technology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 6: 233-53.

Fraser IS, Lun ZG, Zhou JP, Herington AC, McCarron G, Caterson I, T K, Markhan R. (1989) Detailed Assessment of big big prolactin in women with hyperprolactinemia and normal ovarian function. *J Clinical Endocrinol Metab* 69: 585-592.

Glezer A., D'Alva CB, Bronstein MD, Vieira JGH. (2001) Macroprolactina e Incidentaloma Hipofisário. *Arq Bras Endocrinol Metab* 45(2): 190-198.

Gilson, G., Schmit, P., Thix, J., Hoffman, JP., Humbel, RL. (2001) Prolactin Results for Samples Containing Macroprolactin Are Method and Sample Dependent. *Clinical Chemistry* 47: 331-333.

Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. (1994) Correlation of the antibody titres with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. *European Journal of Endocrinology* 130: 438-445.

Hattori N. (1996) The frequency of macroprolactinemia in pregnant women and the heterogeneity of its etiologies. *J Clinical Endocrinol Metab* 81:586-590.

Hauache OM, Rocha AJ, Maia Jr ACM, Maciel RMB, Vieira JGH. (2002) Screening for macroprolactinemia pituitary imaging studies. *Clinical Endocrinology* 57: 327—331.

Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB. (1985) Characterization of a large molecular weight prolactin in women with idiopathic hyperprolactinemia and normal menses. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 258-264.

John R, McDowell IFW, Scanlon MF, Ellis AR. (2000) Macroprolactin reactivities in prolactin assays: an issue for clinical laboratories and equipment manufacturers [Letter]. *Clinical Chemistry* 46:884-885.

Larrea F, Escorza A, Valero A, Hernandez L, Cravioto MC, Diaz-Sanchez V. (1989) Heterogeneity of serum prolactin throughout the menstrual cycle and pregnancy in hyperprolactinemic women with normal ovarian function. *J Clinical Endocrinol Metab* 68: 982-987.

Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza A, Santos MA, Friesen HG. (1992) Characterization of big,big prolactin in patients with hyperprolactinaemia. Clin End 37:365-472 .

Malarkey WB, Jackson R, Wortsman J. (1988) Long-term assesment of patients with macroprolactinaemia. Fertility and Sterility 50: 413-418.

Molitch ME. (1992) Pathologic Hyperprolactinemia. Endocrinol Metab Clin North Am 21(4):877-901.

Molitch ME. (1997) Pituitary incidentalomas. Endocrinol Metab Clin North Am 26:725-40.

Molitch ME.(2002). Prolactin. In: The Pituitary, Shlomo Melmed, 2nd ed. Blackwell Publishing: 119-171.

Mounier C, Trouillas J, Claustrat B, Duthel R, Estour B. (2003) Macroprolactinaemia associated with prolactin adenoma. Hum Rep 18: 853-857.

Ohnami S, Eto S, Ohnami S, Soejima T, Nakata H. (1987) Characterization of big-big prolactin in serum and tumor extracts in patients with PRL secreting tumor. Endocrinol Jpn 34 : 325-334.

Olukoga AO, Kane JW. (1999) Macroprolactinaemia: Validation and application of the polyethylene glycol precipitation test and clinical characterization of the condition. Clin End 51:119-126 .

Rebecca DJ, Wortsman J, Malarkey WB. (1985) Macroprolactinemia presenting like a pituitary tumor. Am J Med 78: 346-350.

Sinha YN. (1995) Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews* 16: 354-369.

Smith CR, Norman MR. (1990) Prolactin and Growth Hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Annals of Clinical Biochemistry* 27: 542-550.

Smith TP, Suliman AM, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ.(2002) Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin(macroprolactin) by commercial immunoassays. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 5410-5415.

Vallete-Kasic S, Morange-Ramos I, Selim A, Gunz G, Morange S, Enjalbert A, Martin PM, Jaquet P, Brue T (2002) Macroprolactinemia revisited : A study on 106 patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 581-588.

Vance ML, Thorner MO. (1995) Prolactin: hyperprolactinemic syndromes and management. In: De Groot L. *Endocrinology*. Volume 1. Third Edition. WB Saunders Company 394-405.

Villar L, Naves, LA, Gadelha M. (2003) Armadilhas no diagnóstico de hiperprolactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47(4): 347-357.

Vieira JGH. (2002) Macroprolactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metab* 46(1): 45-50.

Wortsman J, Carlson HE, Malarkey WB. (1989) Macroprolactinemia as a cause of elevated serum prolactin in men. *Am J Med* 86: 704-706.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é validar uma técnica de screening para Macroprolactina através da precipitação com polietilenoglicol, empregando um ensaio imunoquimioluminescente (Immulite, DPC).

3. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Validação do ensaio imunoquimioluminescente DPC Immulite de prolactina sérica com o teste de precipitação com polietilenoglicol na triagem de macroprolactinemia.

Autores: Pereira CENP, JESUS JR, Vieira JH, Friedman R, Czepielewski MA.

Serviço de Endocrinologia- Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Faculdade de Medicina, UFRGS.

Resumo: A prolactina(PRL) humana circula em múltiplas formas de diferentes tamanhos moleculares, das quais três são detectadas na cromatografia por filtração em gel(CFG): Little ou monomérica(mPRL), Big(bPRL) e Big-Big ou macroprolactina(bbPRL ou macroPRL). Em pessoas normais, a principal forma é a mPRL(85 a 90% do total) com uma pequena proporção de macroPRL. Em algumas pessoas, porém, ocorre uma maior quantidade de macroPRL, um fenômeno denominado Macroprolactinemia, que se sabe estar presente entre 10-25% dos soros hiperprolactinêmicos. É importante a sua identificação para evitar investigação e tratamento desnecessário. O método padrão para sua detecção é a cromatografia por filtração em gel(CFG); porém, a precipitação com polietilenoglicol(PEG) é um método de triagem simples, confiável e de baixo custo. Os testes com PEG originais foram feitos com o ensaio imunofluorimétrico(IFMA) Delfia para PRL. Objetivo: Validar um teste sensível e específico para a triagem de macroPRL baseado no ensaio de PRL quimioluminescente Immulite DPC. Resultados e métodos: Analisamos amostras séricas de 142 pessoas de ambos sexos. Baseado nessas amostras de rotina, dosamos a PRL seguida da precipitação com PEG e cálculo da recuperação de PRL(%R

de PRL). Destes soros, 88 foram submetidos a cromatografia com filtração em Gel. Foi definido um ponto-de-corte para a presença de macroPRL, baseado numa curva ROC, ao comparar-se os resultados do teste de precipitação com PEG e os da CFG. O ponto-de-corte foi definido em 60%, com o achado de um teste com sensibilidade de 88,9% e especificidade de 98,6%. Correlacionou-se a dosagem de mPRL com a presença de macroPRL na cromatografia. Conclusão: Validamos um teste de triagem para macroPRL baseado no ensaio quimioluminescente DPC Immulite com sensibilidade de 88,9% e especificidade de 98,6 % para a porcentagem de recuperação PRL de 60%. O achado de uma valor de mPRL menor ou igual a 20 depois da precipitação com PEG vai suportar este diagnóstico. A prevalência(20,4%) de macroPRL encontrada em nosso estudo, utilizando a metodologia proposta, é semelhante à encontrada na literatura.

Introdução:

A prolactina(PRL) humana consiste de múltiplas formas de diferentes tamanhos. Estudos de cromatografia com filtração em gel mostraram a presença de 3 principais espécies de PRL, que foram denominadas: Little(peso molecular de 23 kDa) ou monomérica - mPRL, Big(peso molecular de 45 a 50 kDa) ou bPRL e Big-Big(peso molecular superior a 100 kDa) ou bbPRL ou macroprolactina(macroPRL). No soro humano, a principal forma é a mPRL, perfazendo cerca de 85 a 90 % do total, com uma pequena porcentagem de macroPRL. No entanto, há alguns indivíduos em que o soro contém maior quantidade de macroPRL, condição denominada de macroprolactinemia.

A macroprolactinemia representa uma das principais causas de hiperprolactinemia(10 a 26 %)(Olukoga & Kane 1999, Vieira et al, 1998, Fahie-Wilson & Soule 1997; Bjoro et al, 1995; Hattori et al 1994). Cattaneo et al, em 2001, com base em vários estudos abrangendo 1430 pacientes, acharam que um em cada 5 pacientes são macroprolactinêmicos. Pacientes com Macroprolactinemia geralmente não apresentam sintomas de hiperprolactinemia como distúrbios

menstruais e galactorréia em mulheres ou libido reduzida e impotência em homens e não têm evidência radiológica de lesão hipofisária(Strachan et al, 2003; Hauache et al, 2002; Leite et al, 1992).

A natureza da macroprolactina não está totalmente elucidada. Foi sugerido que existem múltiplas formas de agregados de PRL assim como a sua ligação com Igs séricas. Evidências recentes indicam que a macroPRL é principalmente um complexo IgG-PRL (Hattori ,1996, Leite et al, 1992). Foi demonstrado que o complexo IgG-PRL é formado por PRL de 23 kDa não-glicosilada que é ligado de modo não covalente a IgG. Também há agregados de mPRL(Hattori, 1996) ligados de forma covalente e não-covalente e em alguns casos é glicosilada(Carlson, 1992).

O teste padrão para a detecção da macroprolactina é a cromatografia por filtração em gel, método demorado, dispendioso e que não pode ser realizado na rotina dos laboratórios clínicos. Um teste baseado na precipitação com polietilenoglicol(PEG) é mais simples e barato. Este teste é recomendado para screening em todos os soros hiperprolactinêmicos por esses autores. A solução de PEG precipita moléculas de grande peso molecular e, portanto, dá uma estimativa da mPRL no soro analisado.

O teste de precipitação com PEG original utilizou o ensaio imunofluorimétrico(IFMA) Delfia para a determinação da dosagem de PRL(Olukoga & Kane 1999, Fahie-Wilson 1999, Vieira et al 1998). Outros ensaios de PRL exigem validação devido a interferência com a solução de PEG. Os ensaios imunoquimioluminescentes(IQL) são hoje largamente usados em vários laboratórios.

Assim, nosso propósito foi validar o teste de precipitação com PEG usando o ensaio DPC Immulite, um ensaio quimioluminescente usado na nossa prática.

OBJETIVO:

Validar um teste sensível e específico para triagem de macroprolactinemia baseado no ensaio quimioluminescente DPC Immulite para PRL sérica.

MÉTODOS E PROCEDIMENTOS:

Foram obtidos 142 soros consecutivos de pacientes analisados no Laboratório Weinmann de Porto Alegre, nos quais foi solicitada e dosada a PRL no período de abril a junho/2001. O resultado desses soros foi usado como controle externo no estudo. Hiperprolactinemia foi definida como um nível de PRL >20 ng/mL. A dosagem de PRL foi medida no controle externo e no Immulite. 88 soros foram submetidos a Cromatografia com Filtração em Gel, com vistas a confirmar a presença de macroPRL.

Os seguintes métodos foram utilizados:

- a) Ensaio de PRL(Centauro, Bayer), usado como controle externo.
- b) Ensaio imunoquimioluminescente para PRL(DPC Immulite, Inglaterra). Um ensaio IQL de fase sólida de dois sítios usando dosador automático.

Um controle de três níveis foi fornecido pelo fabricante para esse propósito. Os coeficientes de variação intra-ensaio variaram entre 5,7 e 6,8 %.

c) Teste de precipitação com PEG: As medidas de PRL foram realizadas com o ensaio Immulite antes e depois da precipitação com PEG. Polietilenoglicol, 200 μ L, com peso molecular de 6000(PEG 6000) foi adicionado a 200 μ L de soro, o qual, após a agitação de 1 min e centrifugado(9500g por 5 min em temperatura ambiente), teve a PRL determinada no sobrenadante. A recuperação de PRL(% R de PRL) foi calculada da seguinte forma: (PRL após precipitação / PRL antes precipitação) X 100. Nós chamamos a PRL resultante no sobrenadante após a precipitação com PEG de mPRL, da mesma forma que Strachan et al(2003). Houve fator de correção no caso do Delfia(ver ANEXO I).

d) Cromatografia por filtração em gel(CFG): A filtração em Gel usou Superdex® S-200(Pharmacia) numa coluna com 1,6 por 30 cm previamente calibrada com(125)I PRL. 1,2 ml de soro foi aplicado e

eluído; alíquotas foram coletadas e analisadas para PRL. As amostras foram consideradas contendo macroPRL quando a área sob a curva(ASC) correspondente a macroPRL representou mais de 30% da área total de eluição de PRL.

e) Estimativa de mPRL: A estimativa de mPRL foi calculada com as seguintes fórmulas: Estimativa de mPRL através de precipitação por PEG(ng/mL)= % R de PRL(Immulite)* PRL basal(ng/mL- Immulite) . Estimativa de mPRL por CFG(ng/mL)=(1- ASC de macroPRL calculada por CFG) * PRL basal (Immulite).

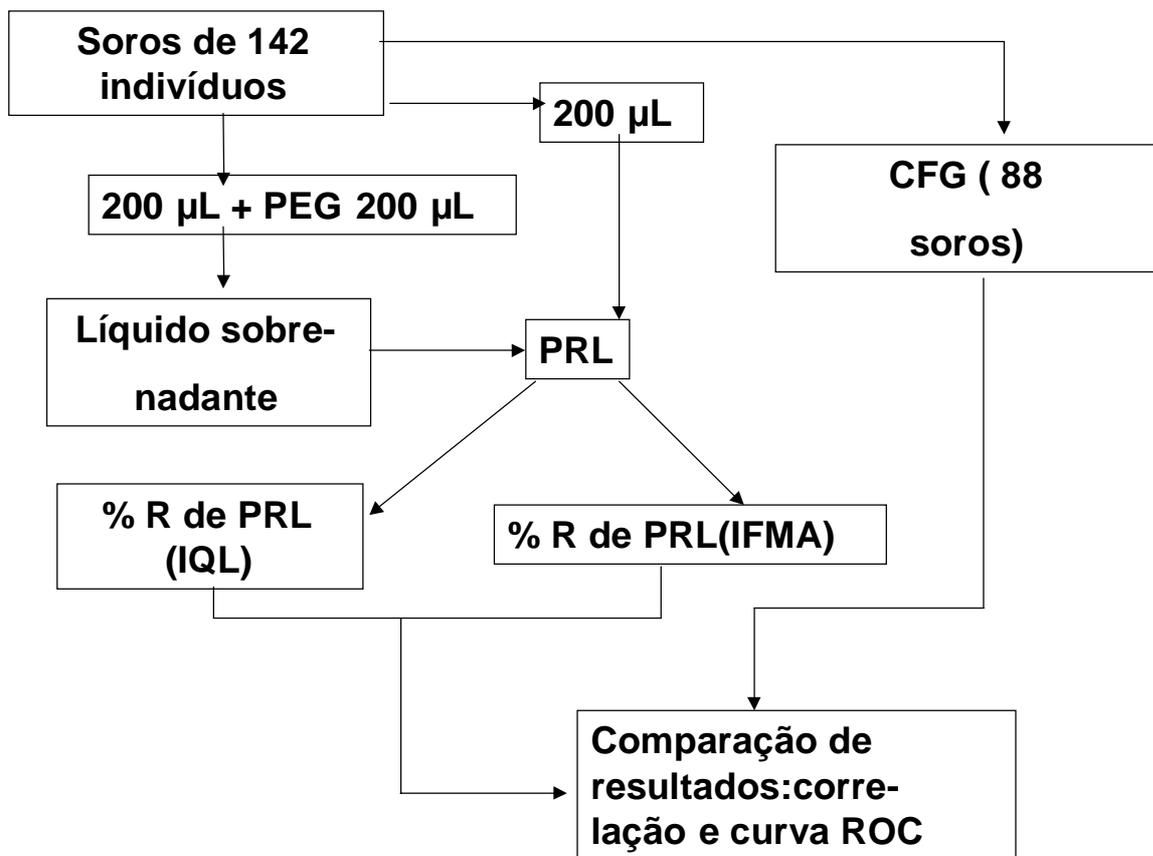


Figura 1: Metodologia. % R de PRL= Porcentagem de recuperação de PRL após PEG. CFG. Cromatografia por filtração em Gel.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados foram analisados nos softwares SPSS 10.0 para Windows(SPSS Inc. Chicago, IL) e Epi-Info(CDC, Atlanta, Geórgia). A

média e desvio padrão foram calculados para a PRL no controle externo e no Immulite. A correlação de Spearman foi realizada para comparar ambos ensaios antes da precipitação com PEG. Após a realização da CFG, uma curva ROC e análise de acurácia comparou os resultados do ensaio Immulite com a macroPRL encontrada na CFG. Um ponto de corte para determinar a presença de macroPRL foi estabelecido. Foi estimado o nível de mPRL por CFG e por precipitação com PEG e os resultados foram submetidos a análise de regressão linear, sendo que determinou-se a equação da reta correspondente. A estimativa de mPRL foi também submetida a análise de curva ROC para estabelecer o nível de corte para presença de macroPRL e, depois, fez-se a análise de acurácia. Um nível de significância de 5% foi usado($p < 0,05$). A reprodutibilidade do teste de precipitação com PEG foi avaliado em quatro amostras de soro diferentes, estudadas três vezes cada com o ensaio Immulite.

RESULTADOS

Durante 4 meses, soros de 142 pacientes foram obtidos. O nível de PRL basal foi determinado através do controle externo com o ensaio Bayer- Centauro e no ensaio Immulite. No primeiro, a média encontrada foi de 56,6 ng/mL, com um desvio padrão de 27,3, enquanto no segundo, a média calculada foi de 45, 2 ng/mL, com um desvio padrão de 26,3. A correlação de Spearman encontrada foi de 84 % (Forte).

Tabela 1: Medidas de tendência central e dispersão no controle externo e no ensaio Immulite antes da precipitação com PEG.

	Bayer Centauro	Immulite
Média	56,6	45,2
DP	27,3	26,3

O soro desses pacientes foi triado para macroprolactina com o teste de precipitação com PEG, usando o ensaio Immulite. A porcentagem de recuperação de PRL(% R de PRL) foi calculada com os

seguintes resultados: Média de 67,83%, desvio-padrão de 21,48 e um intervalo de variação que variou entre 3,52 e 111,6%(Tabela I em anexo I). Digno de nota é o fato que 2 soros(entre 142) deram uma % R de PRL maior que 100%(ver Anexo III). Esse achado foi devido a interferência positiva entre o ensaio Immulite e a solução com PEG.

Oitenta e oito soros foram submetidos a cromatografia por filtração em gel. Nesses casos, a sensibilidade e 1- especificidade da precipitação(% R de PRL) foi comparada aos resultados da CFG. Os achados foram plotados para obter-se a curva ROC correspondente(Figura 2). A concordância de ambos métodos é muito forte(ASC=97,2%).

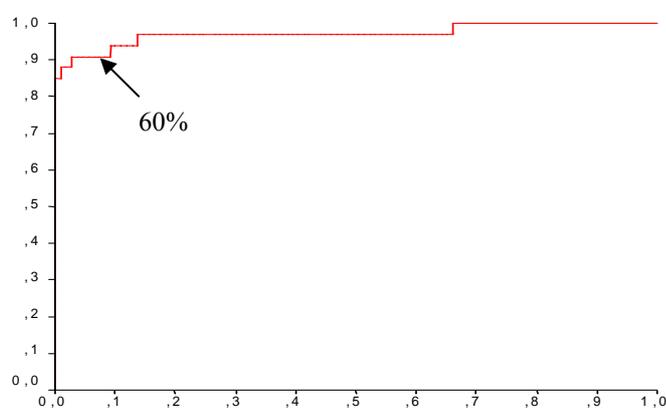


Figura 2: Curva ROC da relação entre % R de PRL e ASC na cromatografia. O valor de 60 de % R de PRL está marcado no gráfico.

Nota: % R de PRL= Porcentagem de recuperação de PRL após precipitação com PEG. ASC= Área sob a curva de macroPRL achada na cromatografia.

Um nível de recuperação de PRL de 60% foi considerado como um bom ponto de corte para triagem de macroPRL, quando comparado ambos métodos. Ele dá uma sensibilidade de 88,9%, uma especificidade de 98,6 % e um Valor Preditivo Positivo de 94,1%(Tabela 2).

Tabela 2: Análise de Acurácia do ponto de corte de 60 % (%R) no Immulite.

CFG positiva	CFG negativa	Total
--------------	--------------	-------

<=60%	16	1	17
>60%	2	69	71
Total	18	70	88

Sensibilidade = 88,9%; Especificidade = 98,6%; Valor Preditivo Positivo =94,1%;
Valor Preditivo Negativo =2,8 %.

A estimativa de mPRL após precipitação com PEG nos 88 casos submetidos a CFG resultou numa média de 28,63 ng/mL e num desvio-padrão de 17,7. A figura 3 mostra o gráfico de dispersão comparando a estimativa de mPRL tanto no ensaio Immulite quanto no perfil de CFG. Uma concordância muito forte foi obtida(r=0,99).

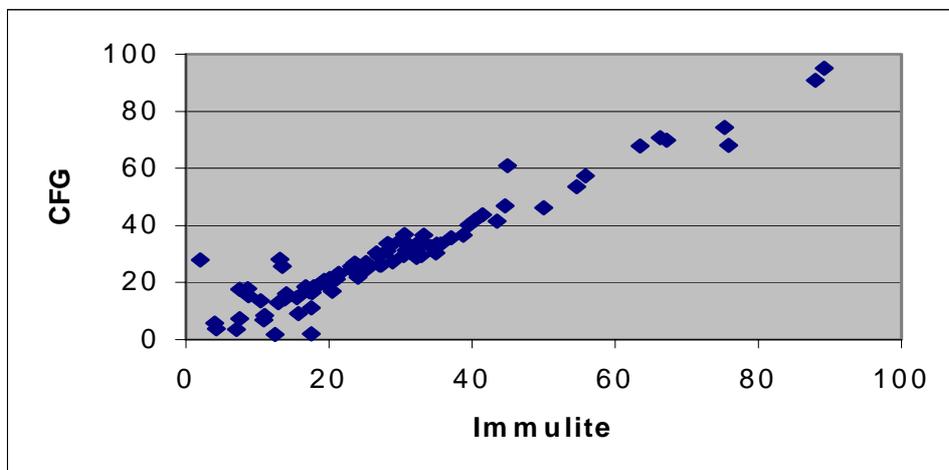


Figura 3: Estimativa de mPRL na Cromatografia por Filtração em Gel e por Immulite e Delfia.

NOTA: $mPRL\ ESTIMADA = PRL\ BASAL * \% R\ PRL$. $Y(GFC) = 0.58 + 1.06X(IMMULITE)$. $r = 0,99$ (n= 88).

Para confirmar essa concordância na estimativa de mPRL com ambos métodos, foi calculada a curva ROC comparando os resultados do ensaio Immulite e da CFG. Foi encontrada uma concordância significativa entre ambos(ASC= 86,6, figura não mostrada).

Nós também fizemos a análise de acurácia em diferentes pontos da curva ROC para estabelecer qual seria o nível de mPRL que corresponderia a uma ASC de 30% na CFG(sugestiva de macroPRL). Um nível de PRL menor ou igual a 20 ng/mL no ensaio Immulite após precipitação com PEG é um bom preditor de presença de macroPRL(

tabela 3). Encontrou-se uma Sensibilidade de 94,4 %; uma especificidade de 78,6 % e um VPN de 1,8 %.

TABELA 3: Acurácia da estimativa de mPRL com o ensaio Immulite.

Estimativa de mPRL	ASC > 30%	ASC ≤ 30%	Total
≤ 20 *	17	15	32
> 20	1	55	56
Total	18	70	88

Notas: ASC- Área sob a curva na CFG. Estimativa de mPRL = PRL basal (Immulite) * PRL R %(Immulite). *O ponto-de-corte de 20 ng/mL foi escolhido com base no resultado da curva ROC.

Usando esse novo critério, encontramos 1 caso, entre 56, que tinha esse nível maior a 20 e uma ASC maior que 30% na CFG(um VPN=0,94).

A reprodutibilidade do teste de precipitação com PEG foi calculado com a repetição da medida de PRL três vezes seguidas em quatro amostras de soro. O coeficiente de variação obtida variou entre 1,5 a 5,7%.

DISCUSSÃO

A macroprolactinemia é um fenômeno comum em soros hiperprolactinêmicos. Assim é importante para o médico saber se o seu ensaio de PRL interfere ou não com a molécula anômala. A precipitação com PEG foi primeiramente validada como teste de triagem para macroPRL com o ensaio Wallac Delfia para PRL. Desde então, o teste também foi validado para os ensaios Elecsys, Bayer Immuno-1 e Abbott Architect(Fahie-Wilson et al 2000; Sale et al 2000, Fahie-Wilson MN(letter) 1999).

Todos métodos para medir PRL mostram um grau de reatividade cruzada com a macroPRL. O grau que isso contribui para a PRL medida depende do anticorpo utilizado. Uma tentativa para estudar essa reatividade variável dos ensaios comerciais foi feito pela UKNEQAS(United Kingdom National External Quality Assessment Scheme). Como resultado da distribuição dos soros contendo

macroPRL, os ensaios foram subdivididos em três classes de acordo com sua reatividade com a macroPRL: baixa, média ou alta(Gilson G et al 2001; John R 2000).

O ensaio Immulite é um método de leitura média quando sua reatividade é avaliada(Smith et al, 2002). Ele tem interferência positiva com a solução de PEG(Gilson G et al 2001). Confirmando resultados de trabalhos prévios, nós também achamos essa interferência positiva que resultou numa recuperação de PRL maior que 100 %. Apenas 2 soros deram esse resultado, o que mostra que essa interferência não é tão freqüente(ver anexo III). Essa interferência positiva apresentada pelo Immulite não inviabiliza a validação do método, visto que o ensaio Immuno-1 também apresenta essa interferência e foi validado por Strachan et al(2003). Devido a esta interferência, não foi utilizado o fator de correção(inteiro 2) na fórmula, após precipitação com PEG. Caso se utilizasse, o número de soros que teriam recuperação maior que 100% seria muito elevado.

Em contraste, o PEG causa interferência negativa com o ensaio Delfia(Fahie Wilson & Soule, 1997). O Delfia (Smith et al, 2002) é um ensaio com maior reatividade quando comparado ao Immulite, na presença de macroPRL.

Não existe um único ponto de corte de área sob a curva na CFG para decidir se um soro tem macroPRL ou não. O valor usado previamente por outros autores foi de 50%(Vallete-Kasic 2002, Olukoga & Kane 1999, Vieira et al 1998). Nós decidimos utilizar o ponto de corte de 30% de ASC para os cálculos estatísticos, um valor menos conservador. Com esse critério, encontramos que um valor menor ou igual a 60% de recuperação de PRL(% R de PRL) no teste de precipitação com PEG foi consistente com o diagnóstico de macroprolactina.

Recentemente, Smith et al(2002) propuseram outro critério baseado para a detecção da macroPRL também embasada no teste de precipitação com PEG. Eles sugeriram que o diagnóstico de macroPRL devesse ser restrito aos casos em que a PRL descesse para um valor

normal após a precipitação com PEG. Nós, da mesma maneira que Strachan et al(2003), assumimos que o valor de PRL após precipitação com PEG é uma estimativa da mPRL(não levando em consideração o valor de bPRL).

O achado da mPRL é importante pois ela deve normalizar com o tratamento, sabendo-se que é a molécula mais ativa biologicamente e/ou tem maior biodisponibilidade(Smith et al, 2002). Em nosso caso, existem muitos falso-positivos mas poucos falso-negativos, quando se leva em consideração a mPRL sozinha, o que dá um critério específico mas pouco sensível. Propomos o uso do achado de % R de PRL menor ou igual a 60% em adição a um nível de mPRL menor ou igual a 20ng/mL para o diagnóstico da presença de macroPRL.

Por último, a prevalência de macroPRL estimada pela % R de PRL com o ensaio Immulite(20,4%) foi similar à achada na literatura. Essa concordância nos embasa a acreditar que a escolha do ponto-de-corte de 30% de ASC para o diagnóstico cromatográfico de macroPRL não foi baixo demais. Ainda, devemos lembrar ao leitor que este estudo foi desenhado para validar o uso do ensaio Immulite com a precipitação com PEG para propósito de triagem e não para estabelecer uma prevalência de macroPRL. Outros estudos com séries maiores são melhores para estimar essa prevalência.

CONCLUSÃO:

Validamos o teste de triagem para macroPRL baseado no ensaio Immulite. O teste foi eficaz para a triagem obtendo-se uma sensibilidade de 88,9 % e especificidade de 98,6 % para a % R de PRL menor ou igual a 60%. Um nível de mPRL maior que 20 ng/mL, após precipitação com PEG, torna improvável a presença de macroPRL, enquanto um valor menor ou igual o suporta. Encontramos um VPN de 2,8% quando comparado com a CFG. Preencher ambos critérios(% R de PRL e mPRL) para o diagnóstico é aditivo. Encontramos uma prevalência de 20,4% de macroprolactinemia na nossa população, semelhante a da literatura.

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos ao Laboratório Fleury de São Paulo pela realização das cromatografias e aos laboratórios Weinmann e Imuno, de Porto Alegre.

Agradecemos a FIPE (Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo apoio financeiro.

4. Artigo Original em inglês.

Validating the DPC Immulite chemiluminescent immunoassay serum prolactin for use with the PEG precipitation test for macroprolactinemia screening.

Authors: Pereira CENP, JESUS JR, Vieira JH, Friedman R, Czepielewski MA.

Summary: Human serum prolactin (PRL) circulates in multiple forms of different molecular sizes of which three major species are identifiable on gel filtration chromatography (GFC). These are Little or monomeric (mPRL), big (bPRL) and big, big (bbPRL). In normal sera there's a small percentage of bbPRL. There are some individuals whose sera contain increased amounts of bbPRL, a phenomenon termed macroprolactinemia, which is known to be present in 10 to 25 % of hyperprolactinemic sera. It is important to identify it for avoiding unnecessary investigation and treatment. The standard method of detecting macroprolactinemia is the Gel Filtration Chromatography(GFC) but the Polyethylene glycol (PEG) precipitation test is a simple, reliable and inexpensive screening test. The original PEG precipitation test was performed with Delfia immunofluorometric assay (IFMA). Objective: Validate a sensitive and specific screening test for the bbPRL based on the DPC Immulite PRL assay. Results and methods: Serum samples from 142 subjects of both sexes were analyzed. Based on these routine samples, we performed PRL measurements followed by PEG precipitation and PRL recovery percentage (PRL R %) was estimated. Within this sample, 88 cases were submitted to GFC. The definition of a cut-off value for the presence of bbPRL was based on a ROC curve when compared to GFC results. The cut-off was set at 60% with the finding of an 88.9 % sensitive and 98.6 % specificity test. We correlated the estimate of mPRL with the chromatographic finding of the bbPRL.

Conclusion: We validated the bbPRL screening employing the DPC Immulite chemiluminescent immunoassay with the finding of a 88.9% sensitive and 98.6% specificity test at the 60% of PRL recovery. The finding of a mPRL lesser or equal to 20 after PEG precipitation will support the diagnosis. The prevalence (20.4%) of the bbPRL found in our study is similar to the literature.

Introduction:

Human serum prolactin (PRL) circulates in multiple forms of different molecular sizes. The three major species are identifiable on gel filtration chromatography (GFC). These are: Little or monomeric prolactin (mPRL), a polypeptide that has a molecular weight of 23 kDa; big prolactin (bPRL), a 50 kDa form, and; big, big prolactin (bbPRL), which has a molecular weight of greater than 100 kDa. The predominant form of prolactin in the human serum is monomeric prolactin (85-95% of total) with a small percentage of bbPRL. There are individuals whose sera contain larger amounts of bbPRL, a phenomenon known as macroprolactinemia.

BbPRL is one of the major causes of hyperprolactinemia (10 to 26% of serum samples)(Olukoga & Kane, 1999; Vieira et al 1998). Cattaneo et al, in 2001, on the basis of a group of 1430 patients from several studies estimated the phenomenon in one out of 5 cases of hiperprolactinemia. Patients with macroprolactinemia usually neither present the symptoms commonly associated with hyperprolactinemia, such as menstrual disturbances and galactorrhea in women and reduced libido and impotency in men, nor have radiographic evidence of a pituitary tumor (Strachan et al, 2003; Hauache et al, 2002; Leite et al, 1992).

The nature of bbPRL is not totally known. It has been suggested that there exist multiple forms of aggregates of PRL and also its binding to serum Igs. Recent evidence indicates that bbPRL is mostly an IgG-PRL complex. (Leite et al, 1992; Hattori ,1996). It was demonstrated that the PRL-IgG complex is formed by 23-kDa nonglycosylated PRL that is noncovalently bound to IgG. There are also covalently and non-

covalently bound aggregates of mPRL (Hattori, 1996) and in some cases it is glycosylated (Carlson, 1992).

The standard method for detecting macroprolactinemia is by gel filtration chromatography (GFC) which is time consuming, expensive, and cannot be a routine practice in clinical laboratories. A screening test using polyethylene glycol (PEG) precipitation to identify bbPRL in serum is simple, reliable and inexpensive. It's recommended for screening in all sera with hyperprolactinemia by these authors. The PEG solution precipitates large molecular weight molecules and thus can give us an estimate of mPRL in the analyzed serum.

The original PEG precipitation test was performed with Delfia immunofluorometric assay (IFMA) (Olukoga & Kane 1999, Fahie-Wilson 1999, Vieira et al 1998). Other PRL assays require validation because of the interference with PEG. Nowadays the chemiluminescent immunometric assays (CLI) are widely employed in routine laboratories.

Therefore, our purpose was to validate the test of PEG precipitation using the DPC Immulite assay, the chemiluminescent immunometric assay used in our practice.

Objective:

Validate a sensitive and specific screening test for the bbPRL based on a chemiluminescent immunometric PRL assay.

Methods:

One Hundred Forty two (142) patients were identified with elevated serum prolactin concentration from routine serum PRL assay requests received in the Weinmann® Lab, in Porto Alegre. This sera were named external control. Hyperprolactinemia was defined as a PRL level in excess of 20 ng/mL. PRL concentrations were measured at the external control and with the Immulite. 88 serum samples were submitted to Gel Filtration Chromatography in order to assess the presence of bbPRL .

The following methods were used:

a) PRL assay (Bayer, Centaur) was used as external control.

b) Chemiluminescent immunometric PRL assay (DPC Immulite, United Kingdom). A solid-phase, two-site chemiluminescent enzyme immunometric (CLI) assay used with an automated analyzer.

A tri-level control provided by the assay manufacturer was used for this purpose. The Intra-assay coefficient of variation (CV) ranges between 5.7 and 6.8 %.

c) Polyethylene glycol (PEG) precipitation test: To 200 μ l of serum, we added 200 μ l of a 250 g/L PEG 6000 solution (in water, kept at 4° C), vortexed for 1 min and centrifuged (9500g for 5 min at room temperature). PRL was determined in the supernatant. The PRL recovery (PRL R %) was then calculated on the basis of the original serum value by the following formula: [immunoreactive PRL after PEG precipitation/ immunoreactive PRL before PEG precipitation] x 100.

d) Gel Filtration Chromatography (GFC): The gel filtration used Superdex [®] S-200(Pharmacia) packed in a 1.6 X 30 cm column previously calibrated with monomeric (125) I PRL; 1.2 ml of serum was applied and eluted; aliquots were collected and analyzed for PRL. The samples were classified as having bbPRL forms when the analysis of the area under the curve (AUC) corresponding to bbPRL represented >30% of the total area of PRL elution. The monomeric PRL (mPRL) was calculated by multiplying total PRL measured by CLI by the percentage of the monomeric hormone yielded by the chromatographic profile.

e) Estimation of mPRL. The estimation was calculated by the following formulas: mPRL estimate = PRL % R* basal PRL; GFC estimation = (1- Big-big GFC percentage area under the curve)* basal PRL. We have named the PRL resulting in the supernatant after the PEG precipitation Test as mPRL using the same criteria of Strachan et Al (2003).

Statistical Analysis:

Data was analyzed using the SPSS 10.0 for Windows and Epi-info software packages. Mean and Standard Deviation were calculated for both external control and Immulite results of basal PRL levels. Spearman's correlation was performed to compare both assays before PEG precipitation. After the performing of the GFC, the ROC curve and Accuracy analysis comparing the results of the Immulite assay and the GFC bbPRL was calculated. A cut-off point for determination of the presence of bbPRL was established. It was estimated the level of mPRL by the GFC and PEG Precipitation Test and the results were submitted to Linear Regression Analysis. The mPRL estimation was also submitted to ROC curve analysis to establish a cut-off point for determining the bbPRL presence and, after that, to make the analysis of accuracy. $P < 0.05$ was considered as significant. Reproducibility of the PEG precipitation Test was evaluated in four different sera samples, studied three times each in the Immulite assay.

Results:

Over 4 months, 142 doctor's orders for serum PRL were obtained. The basal PRL level was determined at the External Control using the Bayer Centaur and the Immulite CLI assays. In the former, the mean was calculated as 56.6 ng/mL, with a 27.3 of Standard Deviation, while in the second case, the results were a mean of 45.2 ng/mL with a 26.3. The Spearman correlation was 84 % (Strong).

Table 1: Mean and Standard Deviation in External Control and the Immulite before PEG precipitation.

	Bayer Centaur	Immulite
Mean	56.6	45.2
SD	27.3	26.3

Sera from these patients were screened for macroprolactinemia by the PEG precipitation test using the Immulite assay. The PRL R % was calculated with the following results: the mean was 67.83%, the Standard

Deviation, 21.48 and the Interval of variation ranged from 3.52 to 111.16%(Table 1, in Anexos I and Anexo III).

Noteworthy is that 2 serum samples gave a PRL R % greater than 100%. This finding was because of the positive interference between the Immulite assay and the PEG solution.

Eighty-eight serum samples were submitted to Gel Filtration Chromatography. In these cases, the Sensitivity and 1- specificity of the precipitation method(PRL R %) were compared to the GFC results. The findings were plotted to obtain the corresponding ROC curve (Figure 1). The concordance of both methods is very strong (AUC = 97.2%).

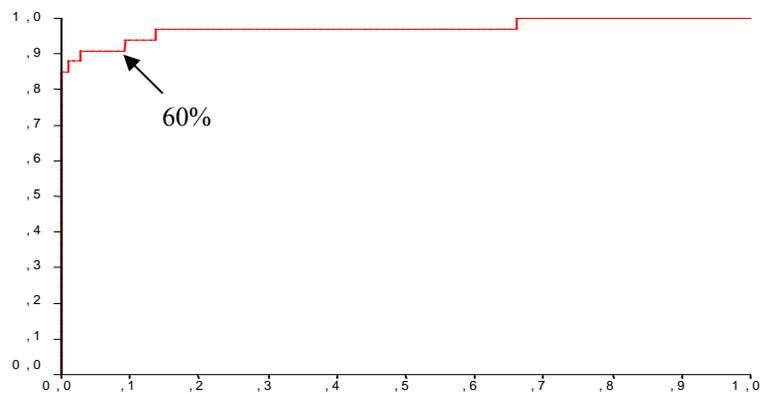


FIGURE 1. ROC CURVE OF COMPARISON BETWEEN PRL R % (IMMULITE) AND GFC PROFILE. GFC POSITIVE= 18 CASES. NEGATIVE= 70. AREA UNDER THE CURVE= 97.2%. The 60 % cut-off point is shown in the graphic. Note: % R PRL = Percentage of PRL recuperation.

The level of PRL recovery of 60 % was considered as a good cut-off point for bbPRL screening when we compared both methods. It gave a sensitivity of 88.9, a specificity of 98.6 and a positive predictive value of 94.1%(Table 2).

TABLE 2: ACCURACY ANALISYS AT THE 60% CUT-OFF POINT.

	GFC positive	GFC negative	Total
<=60%	16	1	17
>60%	2	69	71
Total	18	70	88

Notes: Sensitivity = 88.9%; Specificity = 98.6%; Positive Predictive Value =94.1%; Negative Predictive Value =2.8%.

The estimate of mPRL after PEG precipitation in the 88 Cases resulted in a mean of 28.63 and a standard deviation of 17.7. The figure 2 shows the dispersion graphic comparing the estimate of the mPRL level with both the Immulite assay and GFC profile. A very strong concordance was obtained(r=0.99).

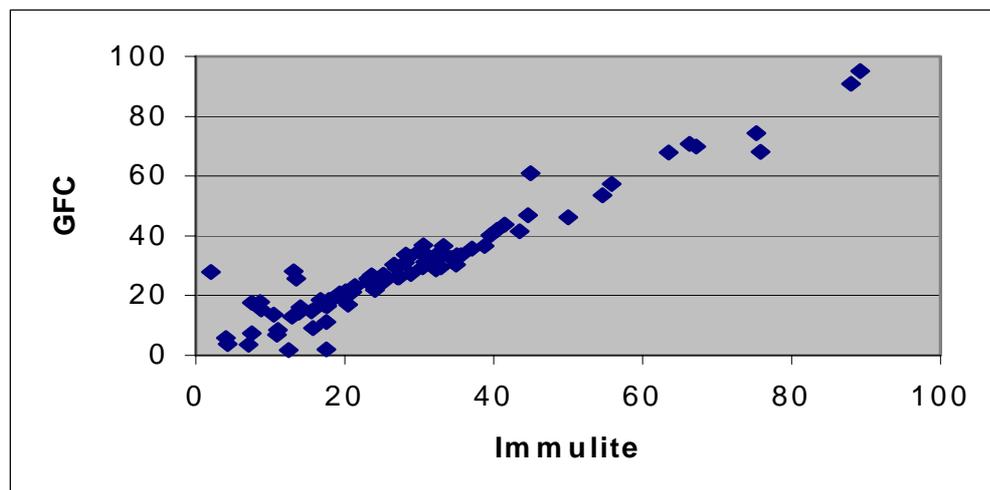


FIGURE 2: ESTIMATE OF mPRL WITH THE IMMULITE ASSAY AND COMPARISON WITH GFC RESULTS:

NOTES: ESTIMATED mPRL = PRL BASAL * PRL R %. LINEAR REGRESSION ANALYSIS: $Y(\text{GFC}) = 0.58 + 1.06X(\text{IMMULITE})$. $R = 0.99$ (n=88)

To further confirm this concordance in the estimate of the mPRL with both methods results, we plotted a ROC curve comparing the results of the Immulite assay and GFC profile. There was an also a significant accordance between both (AUC= 86.6, figure not shown).

We also made the accuracy analysis at different points of the ROC curve to establish what would be the Immulite mPRL level that corresponds to the GFC > 30 % of bbPRL AUC(suggestive of bbPRL) in

the GFC profile. We found that a PRL level lesser or equal to 20 ng/mL in the Immulite assay after PEG precipitation is a good predictor of bbPRL presence (Table 3). We found a sensitivity of 94.4%, a specificity of 78.6 % and a NPV of 1.8%.

TABLE 3: ACCURACY OF mPRL ESTIMATE WITH IMMULITE ASSAY.

Estimate of mPRL	AUC> 30%	AUC <= 30%	Total
<= 20 *	17	15	32
> 20	1	55	56
Total	18	70	88

Notes: AUC- Area under the curve – found in GFC. Estimated mPRL = PRL basal (Immulite) * PRL R %(Immulite). *The cut-off value of 20 ng/mL was chosen based upon the ROC curve results.

Using that new criterion we found that 1 out of 56 cases had the mPRL level greater than 20 and a GFC with a bbPRL AUC greater than 30% in the GFC(a NPV= 1.7%).

Reproducibility of the PEG precipitation test was calculated from the repetition of the PRL measurement for 3 times in four different serum samples. The % coefficient of variation obtained was between 1.5 to 5.7.

Discussion:

Macroprolactinemia is a common phenomenon in hyperprolactinemic serum. Thus it is important for the physician to know whether or not his serum PRL assay interferes with the anomalous bbPRL molecule. PEG precipitation has been first validated as a screening method for bbPRL with the Wallac Delfia PRL assay. Since then, the test has also been validated for the Elecsys PRL assay, the Bayer Immuno-1 PRL assay and Abbott Architect PRL(Fahie-Wilson et al 2000; Sale et al 2000, Fahie-Wilson, 2000; Fahie-Wilson MN (letter) 1999).

All methods of measuring PRL will show some cross-reactivity with bbPRL. The extent it contributes to the measured prolactin concentration depends on the antibody used in that assay. An attempt to study this

variable reactivity with commercial immunoassays for PRL was made by the UKNEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Scheme). As a result of distribution of serum containing bbPRL, immunoassays for the measurement of PRL have been subdivided into three classes according to their reactivity with bbPRL: low, medium, and high-reading methods (Gilson G et al 2001; John R 2000).

The Immulite assay is a medium -reading method as far as its reactivity is concerned (Smith et al, 2002). It has positive interference with the PEG solution (Gilson G et al 2001). Confirming suggestions of previous studies, we also found that PEG cause positive interference in the Immulite assay giving a PRL recovery of greater than 100% with the assay standard. Only two samples gave a value greater than 100 % of PRL R %, what shows that interference is not that often(anexo III). Because of this, we choose not to use a dilution correction factor(integer 2), as some authors do use with the Delfia assay. For we had used, the number of sera samples giving results greater than 100% would be higher.

This positive interference presented with the Immulite assay doesn't enable the validation of the method, since the Immuno-1 assay also has it and was validated by Strachan et al(2003). By contrast, PEG causes a negative interference with the Delfia assay (Fahie Wilson & Soule, 1997). The Delfia (Smith et al, 2002) is a more reacting assay when compared with the Immulite, in the presence of bbPRL.

There is not a single cut-off value of area under the curve in the GFC to decide if the serum has bbPRL or not. The point commonly used by others authors is 50% ou bbPRL AUC(Area under the curve) in the GFC profile(Olukoga & Kane 1999, Vieira et al 1998, Vallete-Kasic 2002). We decided to set the cut-off to 30% for means of statistical calculations, a less conservative cut-off. Using this criterion, we found that a value < or equal to 60% of prolactin recovery (PRL R %) in the PEG precipitation test was consistent with the diagnosis of macroprolactinemia.

Recently Smith et al (2002) have proposed another criterion for the detection of the bbPRL based in the PEG precipitation test. They suggested that the diagnosis of bbPRL should be restricted to the cases where the PRL serum fell to the normal range after the PEG precipitation. We, in the same way as Strachan et al(2003), assumed that this value after precipitation is an estimate of the mPRL(not taking into account the lesser presence of bPRL).

The finding of mPRL is important because it should normalize after treatment because it's the PRL molecule that has major bioactivity and/or bioavailability. Besides this, more recent studies suggest that the assessment of the efficacy of treatment and even the diagnosis of the pathology, should take into consideration not only the presence of the bbPRL molecule, but also the normalization of mPRL levels (Smith et al, 2002).

In the studied cases, there are many false-positives but few false-negatives when taking into consideration the mPRL alone, what give us a specific but not sensitive criteria. We propose to use the finding of the PRL R % of lesser or equal to 60% in addition to a level of mPRL lesser or equal to 20ng/mL for the diagnosis of the bbPRL presence.

At last, the prevalence of bbPRL as estimated by the PRL R % with the Immulite assay (20.4%), was similar to that one found in the literature. This concordance help us believe that the choice of the 30% cut-off point of AUC chosen for the chromatographic diagnosis of bbPRL wasn't too low.

Nevertheless, the reader should remember that this study was designed to validate the use of the CLI assay in the PEG precipitation test for screening purposes, and not to establish the true prevalence of bbPRL. Other studies with larger series are better to estimate this prevalence.

Conclusion:

We validated the bbPRL screening based on the CLI Immulite assay. The test was very efficient for screening purposes with a finding of an 88.9% sensitive and 98.6% specificity test at the 60% of PRL

recovery. A level of mPRL greater than 20 ng/mL after PEG precipitation will turn into improbable the presence of the bbPRL while a level lesser or equal will support it. We found a NPV of 2.8% when compared with GFC. Fulfilling both criteria(PRL R % and mPRL) for the diagnosis are addictive. We found a 20.4% prevalence of the macroprolactinemia phenomenon in our population, similar to that of the literature.

Acknowledgements:

Thank Fleury Labs (São Paulo) and Weinmann and Imuno Labs (Porto Alegre) for their support. This study was partly financed by Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA.

5. REFERÊNCIAS DOS ARTIGOS:

Bjoro T, Morkrid L, Wergeland R, Turter A, Kvistborg A, Sand T, Torjesen P. (1995) Frequency of hyperprolactinaemia due to large molecular weight prolactin (150-170 kDa). *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 55: 139-147.

Carlson HE, Markoff E, Lee DW. (1992) On the nature of serum prolactin in two patients with macroprolactinemia. *Fertility and Sterility*, 86(1): 78-87.

Cattaneo F, Kappeler D, Muller B. (2001) Macroprolactinaemia, the major unknown in the differential diagnosis of hyperprolactinaemia. *Swiss Med Weekly* 131: 122-126

Fahie-Wilson MN. (1999) Polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia [Letter]. *Clinical Chemistry*, 45:436-7.

Fahie—Wilson MN, Soule SC. (1997) Macroprolactinaemia: contribution to hyperprolactinaemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based on precipitation with polyethylene glycol. *Annals of Clinical Biochemistry*, 34:252-8.

Fahie-Wilson M, Brunsden P, Surrey J, Everitt A. (2000) Macroprolactin and the Roche Elecsys prolactin assay: characteristics of the reaction and detection by precipitation with polyethylene glycol [Technical Brief]. *Clinical Chemistry*, 46:1933-1935.

Gilson, G., Schmit, P., Thix, J., Hoffman, JP, Humbel, RL. (2001) Prolactin Results for Samples Containing Macroprolactin Are Method and Sample Dependent. *Clinical Chemistry*, 47: 331-333.

Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. (1994) Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. *European Journal Endocrinology*, 130: 438-445.

Hattori N. (1996) The frequency of macroprolactinemia in pregnant women and the heterogeneity of its etiologies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81: 586-590.

Hauache OM, Rocha AJ, Maia Jr ACM, Maciel RMB, Vieira JGH. (2002) Screening for macroprolactinemia pituitary imaging studies. *Clinical Endocrinology* 57: 327—331.

John R, McDowell IFW, Scanlon MF, Ellis AR. (2000). Macroprolactin reactivities in prolactin assays: an issue for clinical laboratories and equipment manufacturers [Letter]. *Clinical Chemistry*, 46:884-885.

Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza A, Santos MA, Friesesn HG. (1992) Characterization of big-big prolactin in patients with hyperprolactinaemia. *Clinical Endocrinology*, 37: 365-472.

Mounier C, Trouillas J, Claustrat B, Duthel R, Estour B. (2003) Macroprolactinaemia associated with prolactin adenoma. *Hum Rep* 18: 853-857.

Olukoga AO, Kane JW. (1999) Macroprolactinaemia: Validation and application of the polyethylene glycol precipitation test and clinical characterization of the condition. *Clinical Endocrinology*, 51: 119-126.

Sale JK, Hughes HR, Fahie-Wilson MN. (2000) Macroprolactin and the Abbott Architect prolactin assay: characteristics of the reaction and detection by precipitation with polyethylene glycol [Abstract]. In: Martin SM, ed. *Proceedings of Pathology*. London: Association of Clinical Biochemists, 149.

Smith TP, Suliman AM, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ. (2002) Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immunoassays. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 5410-5415.

Strachan MWJ, Teoh WL, Don-Wauchope AC, Seth J, Stoddart M, Beckett GJ (2003) Clinical and radiological features of patients with macroprolactinaemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 59: 339-346..

Vallete-Kasic S, Morange-Ramos I, Selim A, Gunz G, Morange S, Enjalbert A, Martin PM, Jaquet P, Brue T (2002) Macroprolactinemia revisited : A study on 106 patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 581-588.

Vieira JGH, Tachibara TT, Obara LH, Maciel RMB. (1998) Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia [Technical Brief]. *Clinical Chemistry*, 44:1758-1759.

6. ANEXOS

ANEXOS I. COMPARAÇÃO IMMULITE E AUTODELFIA.

Tabela 1: Média, Desvio Padrão e Intervalo de variação da % R após PEG em 142 soros.

variação	Média	Desvio Padrão	Intervalo
Immulite	67,83	21,48	3,52-111,16*
Delfia	65,09	21,99	2,33-93,31

*2 soros tiveram recuperação(% R)> 100 %(VER ANEXOIII).

Nota: No cálculo do Delfia, foi utilizado o fator de correção 2(

(PRL após precipitação X 2/ PRL antes precipitação) X 100).

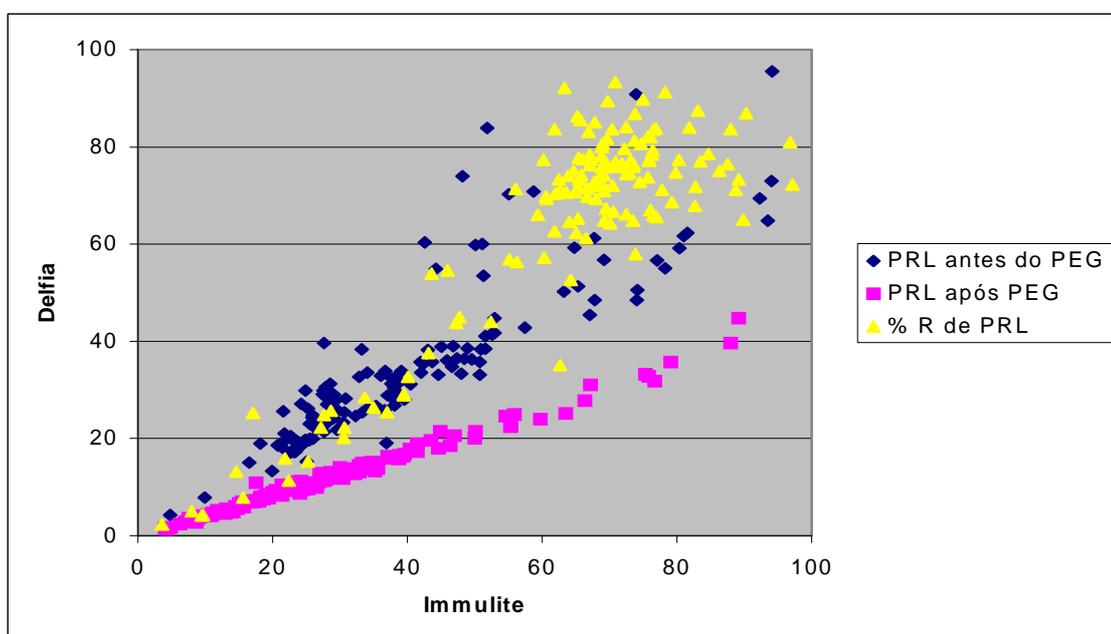


Figura 1: Comparação entre resultado de PRL antes da precipitação com PEG, depois dela e comparação da % R de PRL entre os métodos de Immulite e a Cromatografia com filtração em Gel.

Nota: Correlação de Spearman(PRL antes do PEG: $R_s=0,93$, $p<0,0001$;

PRL após PEG: $R_s=0,99$, $p<0,0001$, % R de PRL: $R_s=0,88$, $p<0,0001$).

% R de PRL= Porcentagem de recuperação de PRL.

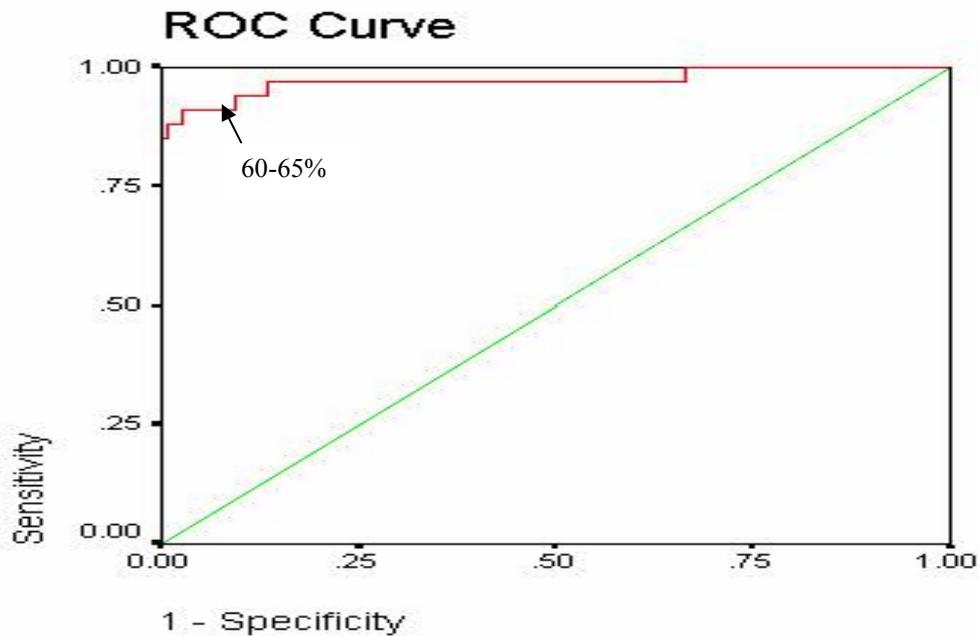


Figura 2: Curva ROC comparando % R de PRL obtido no Immulite e no Delfia.

Nota: Mostrado o ponto de corte entre 60-65 % de R de PRL no Immulite, que corresponde a uma recuperação de cerca de 30% no Delfia.

Uma recuperação no Immulite entre 60 e 65% corresponde a uma sensibilidade e especificidade de 84,7 e 97,1 %, e 97,3 e 90%, respectivamente, em comparação ao Delfia com recuperação até 30%. A área sob a curva encontrada foi de 97%.

TABELA 2- Acurácia do ensaio Delfia no ponto de corte de 30%.

	CFG +CFG-		Total
<30%	16	3	19
>30%	2	66	68
Total	18	69	87

Sens.= 88,5%; Espec.= 95,6%; VPP=84%; VPN= 3%. CFG= Cromatografia por filtração em Gel;

Sens.= Sensibilidade; Espec.= Especificidade. VPP= Valor Preditivo Positivo. VPN= Valor Preditivo Negativo.

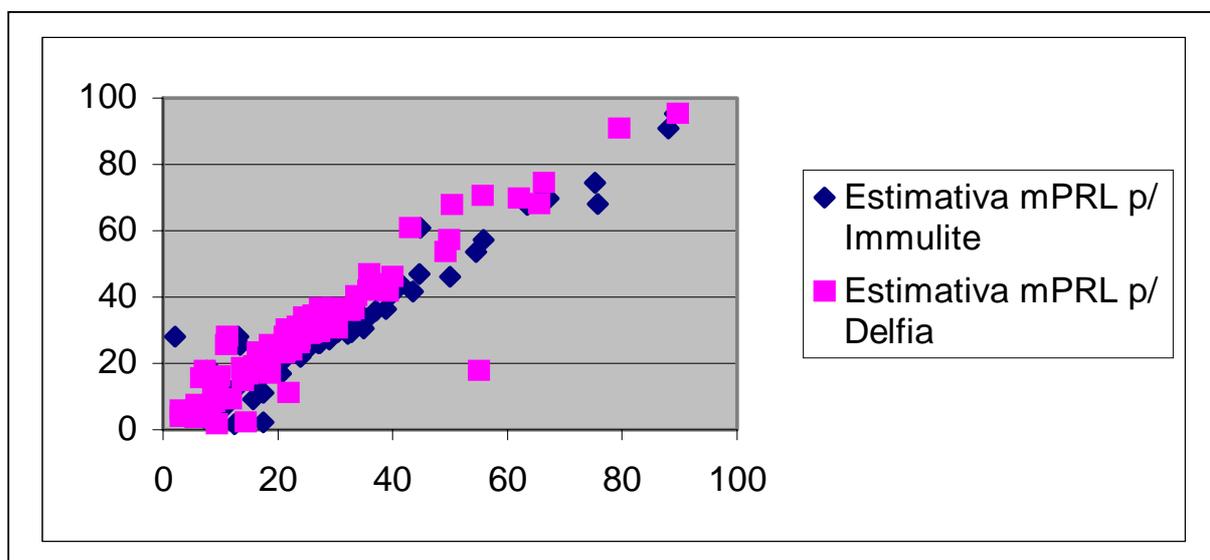


Figura 3: Comparação entre a estimativa de mPRL por Immulite e por Delfia. Correlação de Pearson resultou igual em ambos casos($r^2=76,27$).

Nota: mPRL= Prolactina monomérica.

ANEXOS II. TIPOS DE PRL NA CROMATOGRAFIA.

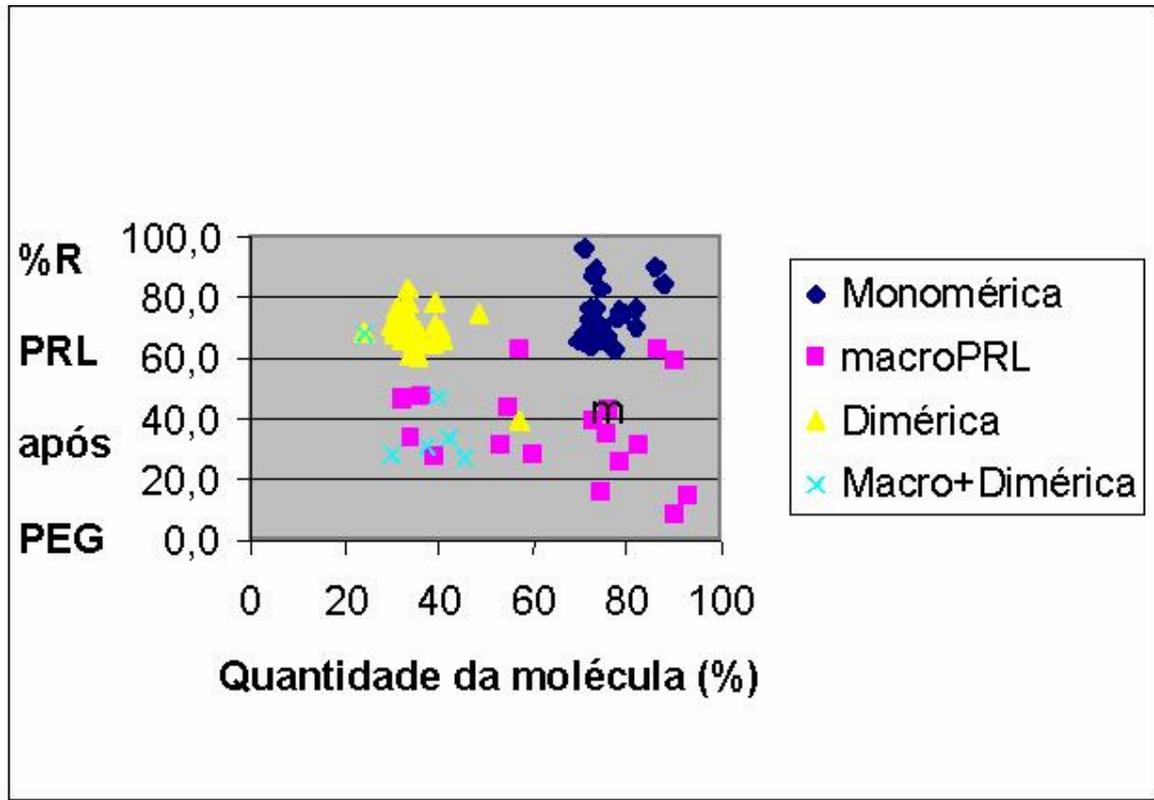


Figura 1: Relação entre forma de PRL, como avaliada por CFG, e %R PRL após precipitação com PEG e análise no Immulite.

Nota: O Teste T para amostras não pareadas mostrou que existe diferença significativa de %R de PRL entre os dois grupos(mPRL versus bPRL) a nível de 5% de significância($p < 0,007$). Não houve diferença entre os outros grupos. Para fins de predomínio de macroPRL, foi considerada a presença de $\geq 30\%$ de macroPRL na CFG, valor usado na maioria dos estudos similares. Para aumento de bPRL também usou-se valores $\geq 30\%$.

ANEXO III. RESULTADOS DE CONTROLE EXTERNO, IMMULITE E AUTODELFIA.

amostra	controle	Immulite		Autodelfia	
		PRL inicial	% R PRL	PRL inicial	% R PRL
1	129,1	111,00	67,84	78	85,13
2	50,2	48	67,08	33,3	76,28
3	48,6	37,6	76,86	28,4	83,80
4	51,3	38,5	70,91	29,4	76,87
5	88,7	4,79	89,14	4,2	73,33
6	155,2	107	70,84	70,3	93,31
7	58,3	40,5	76,05	31,2	82,05
8	66,3	43	90,23	38,2	86,91
9	31,7	23	76,52	17,6	83,52
10	58,7	46,6	76,39	34,8	79,31
11	36,6	27,9	69,18	23	74,17
12	34,6	16,5	43,09	15	37,60
13	51,6	41,9	81,86	35,7	84,03
14	36,8	27,6	72,46	21,3	84,13
15	92,2	78,3	69,73	55	89,45
16	42,5	50,1	8,00	59,8	5,05
17	44,8	34,3	68,80	26,5	80,00
18	59,9	57,4	70,38	42,8	83,64
19	62,8	48,9	62,58	38,6	70,98
20	45,3	29,7	65,32	25,7	65,29
21	50,9	33,2	39,46	38,3	29,09
22	124,1	9,93	75,73	7,87	73,70
23	33,1	27,9	39,43	30,6	28,82
24	116,1	94	70,53	73	76,16
25	51,2	50,9	65,42	38,3	77,81
26	30,9	25,5	72,16	19,9	79,60
27	43,9	28,8	87,50	28,5	76,49
28	46,4	42,3	66,67	35,3	69,69
29	37,2	33,3	69,37	25,4	76,93
30	35,3	29	73,79	24,2	86,78
31	38,2	28,1	84,70	27	78,52
32	47,7	37,1	65,50	28,9	73,36
33	45,1	29	83,45	29,1	76,98
34	42,9	50,7	60,16	33,1	77,34
35	67,1	141	63,26	97,2	92,18
36	41,8	120	14,58	165	13,21
37	36,9	35,3	66,86	26,7	83,15
38	139,9	27,4	27,59	29,1	24,81
39	89,6	65,3	45,94	51,3	54,58

amostra	controle	Immulite		Autodelfia	
		PRL inicial	% R PRL	PRL inicial	% R PRL
40	54,2	49,5	74,95	36,3	89,81
41	34,9	27,8	83,09	23,1	87,45
42	63	44,6	78,25	33,1	91,24
43	50,6	42	75,71	33,6	82,14
44	35,7	26,5	75,85	21,9	77,35
45	48,8	38,8	69,59	31,6	81,65
46	65,1	58,7	34,92	70,8	26,38
47	45,6	25	43,60	15,2	53,95
48	32	23,3	72,96	19,3	74,61
49	111,8	94,1	47,72	95,5	45,03
50	68,6	67,1	61,85	45,4	83,70
51	44,3	30,8	87,99	28,2	83,69
52	114,3	81	69,01	61,7	80,71
53	41,1	44,2	30,54	54,9	20,11
54	46,3	36,7	28,61	33,9	25,72
55	37,2	23,7	65,40	19,4	71,65
56	44,2	34	96,76	33,6	80,95
57	33,4	21,7	76,96	21	65,62
58	56	50,7	67,06	35,7	78,43
59	53,1	43,7	76,20	35,7	78,43
60	31,2	26	68,85	19,9	72,16
61	43,3	27,6	62,68	39,6	35,10
62	42,8	26	73,46	24,7	64,86
63	49,3	36,1	77,84	32,9	71,12
64	34,8	26,3	79,85	22,6	74,69
65	66,9	77,1	64,85	56,6	70,67
66	39,9	25,5	76,08	23	67,04
67	129,7	134	65,67	92,9	85,47
68	116,9	103	65,24	71,9	86,23
69	57,4	47,3	64,69	36,5	75,07
70	94,2	63,2	68,83	50,2	78,09
71	33,7	51,3	30,60	53,5	22,17
72	34,8	24,3	69,14	18,6	75,81
73	60	94,9	21,81	107	15,91
74	78,5	52,9	74,67	41,7	80,58
75	39,2	26,1	33,64	23,4	28,46
76	45,6	38,3	69,19	27,9	70,97
77	35	25,9	82,63	24,3	67,82
78	38,4	25,4	70,47	19,6	72,04
79	41,6	39,1	73,15	33,9	77,29

amostra	controle	Immulite		Autodelfia	
		PRL inicial	% R PRL	PRL inicial	% R PRL
80	67,5	67,8	65,78	48,5	74,23
81	36,2	36,6	68,85	25,8	74,42
82	98	92,3	68,80	69,4	72,62
83	39,5	29	82,76	24,2	71,82
84	45,5	51,1	25,24	60	15,20
85	31,1	21,5	64,19	18,1	52,60
86	55,7	55	15,64	70,3	7,82
87	42,4	38,1	60,63	26,8	69,25
88	57,2	48,4	67,77	36,4	71,98
89	60,1	51,6	68,02	38,4	69,27
90	30,3	23,4	60,26	17,3	57,23
91	52,1	37,7	70,56	32,4	66,67
92	37,8	22,7	79,30	20,5	68,59
93	38	32,3	75,85	24,6	77,15
94	55,2	38	80,26	30,5	77,38
95	31,3	19,9	62,81	13,3	70,83
96	35,8	29,5	59,32	21,8	65,96
97	30,1	23,1	64,07	17,3	64,62
98	50	24,2	111,16	27,1	81,92
99	33,2	22,7	66,08	17,1	77,43
100	95,7	67,7	69,42	61,2	67,32
101	34,3	36,9	17,02	19,1	25,24
102	32,8	20,8	56,25	18,5	56,32
103	69,1	51,6	63,57	41,1	70,56
104	49,4	32,8	76,52	32,7	66,06
105	31,6	27,5	61,82	23,1	62,68
106	79,2	69,2	72,40	56,7	75,84
107	82,5	74,1	62,48	50,5	73,27
108	87,7	81,6	67,77	62,3	72,87
109	46,7	27,5	88,73	29,8	71,14
110	30,4	20,7	70,05	18,6	64,30
111	62,2	52,5	71,81	41,5	76,63
112	43,2	42,6	9,67	60,4	4,24
113	30,8	24,9	66,67	19,7	71,47
114	37,6	130	3,56	144	2,33
115	139,8	73,9	107,04	90,9	78,55
116	36,2	30,5	61,97	23,3	70,39
117	65,8	45,9	70,37	36,1	75,90
118	81,2	74	56,08	48,5	71,34
119	31,5	27,7	40,07	28,8	32,64

amostra	controle	Immulite		Autodelfia	
		PRL inicial	% R PRL	PRL inicial	% R PRL
120	108,7	51,8	9,44	83,9	4,17
121	42,9	25,2	73,81	26,1	57,93
122	56,1	39,5	60,51	28	69,86
123	41	21,6	89,81	25,6	65,00
124	34	30,6	73,53	25,4	75,91
125	71	52,9	74,48	44,8	72,77
126	30,1	21,8	66,51	19,6	61,22
127	36,1	29,1	27,18	29	22,28
128	115,2	114	67,28	82,1	77,47
129	35,6	24,9	36,95	29,9	25,42
130	36,7	24,7	73,68	19,5	81,23
131	50,2	48,2	22,41	74	11,32
132	38,7	28,6	65,03	24,6	62,36
133	47,3	28,5	97,19	31,3	72,20
134	62,7	46,8	72,44	39	74,36
135	37,6	25,8	72,48	23,3	66,09
136	101	80,4	68,78	59,1	75,80
137	64,1	52,6	73,57	41,4	76,33
138	44,7	29,2	86,30	27,7	75,09
139	55,5	38,3	69,19	32,7	64,83
140	74,3	64,8	47,22	59,3	43,84
141	31,9	18,2	52,42	19	44,00
142	114	93,5	63,85	64,8	74,07

ANEXOS IV. RESULTADOS DE SOROS SUBMETIDOS A CROMATOGRAFIA (CFG).

Resultados de PRL inicial, %R de PRL, % macroPRL presente na cromatografia, e estimativa de PRL não-Macro nos ensaios Immulite, Delfia e na cromatografia por filtração em gel. (n: 1 a 30).

PRL inicial		% R de PRL		% macroPRL	Estimativa mPRL		
Immulite	Delfia	Immulite	Delfia	CFG	Immulite	Delfia	CFG
111.00	78.0	67.8	85.12	4.60	75.3	66.39	74
48.00	33.3	67.1	76.26	13.50	32.2	25.39	29
37.60	28.4	76.9	83.80	3.80	28.9	23.80	27
38.50	29.4	70.9	76.86	11.00	27.3	22.60	26
4.79	4.2	89.1	73.32	8.30	4.3	3.08	4
107.00	70.3	70.8	93.30	3.00	75.8	65.59	68
40.50	31.2	76.0	82.04	0.00	30.8	25.60	31
43.00	38.2	90.2	86.90	4.40	38.8	33.20	37
23.00	17.6	76.5	83.52	5.80	17.6	14.70	17
46.60	34.8	76.4	79.30	3.80	35.6	27.60	33
27.90	23.0	69.2	74.16	9.80	19.3	17.06	21
16.50	15.0	43.1	37.60	76.10	7.1	5.64	4
41.90	35.7	81.9	84.02	8.70	34.3	30.00	33
27.60	21.3	72.5	84.12	5.30	20.0	17.92	20
78.30	55.0	69.7	89.44	2.40	54.6	49.19	54
50.10	59.8	8.0	5.04	90.30	4.0	3.01	6
34.30	26.5	68.8	80.00	10.80	23.6	21.20	24
57.40	42.8	70.4	83.64	2.20	40.4	35.80	42
48.90	38.6	62.57	70.98	4.70	30.6	27.40	37
29.70	25.7	65.3	65.28	24.40	19.4	16.78	19
33.20	38.3	39.5	29.08	26.70	13.1	11.14	28
9.93	7.9	75.7	73.68	5.10	7.5	5.80	7
27.90	30.6	39.4	28.82	72.60	11.0	8.82	8
94.00	73.0	70.5	76.16	3.20	66.3	55.60	71
50.90	38.3	65.4	77.80	4.20	33.3	29.80	37
25.50	19.9	72.2	79.58	4.30	18.4	15.84	19
28.80	28.5	87.5	76.48	5.00	25.2	21.80	27
42.30	35.3	66.7	69.68	4.30	28.2	24.60	34
33.30	25.4	69.4	76.92	3.60	23.1	19.54	24
29.00	24.2	73.8	86.76	4.80	21.4	21.00	23

Resultados de PRL inicial, %R de PRL, % macroPRL presente na cromatografia, e estimativa de PRL não-Macro nos ensaios Immulite, Delfia e na cromatografia por filtração em gel. (n: 31 a 60).

PRL inicial		% R de PRL		% macroPRL	Estimativa mPRL		
Immulite	Delfia	Immulite	Delfia	CFG	Immulite	Delfia	CFG
28.10	27.0	84.7	78.50	2.10	23.8	21.20	26
3.10	28.9	65.5	73.34	3.40	2.0	21.20	28
29.00	29.1	83.4	76.96	17.60	24.2	22.40	24
50.70	33.1	60.2	77.34	11.30	30.5	25.60	29
141.00	97.2	63.3	92.18	2.10	89.2	89.60	95
120.00	165.0	14.6	13.20	93.30	17.5	21.78	11
35.30	26.7	66.9	83.14	0.00	23.6	22.20	27
27.40	29.1	27.6	24.80	39.10	7.6	7.22	18
65.30	51.3	45.9	54.58	32.30	30.0	28.00	35
49.50	36.3	74.9	89.80	1.50	37.1	32.60	36
44.60	33.1	78.3	91.22	8.00	34.9	30.19	30
42.00	33.6	75.7	82.14	4.60	31.8	27.60	32
26.50	21.9	75.8	77.34	2.50	20.1	16.94	21
38.80	31.6	69.6	81.64	7.60	27.0	25.80	29
58.70	70.8	34.9	26.38	75.90	20.5	18.68	17
25.00	15.2	43.6	53.94	54.70	10.9	8.20	7
23.30	19.3	73.0	74.60	6.70	17.0	14.40	18
94.10	95.5	47.7	45.02	36.20	44.9	42.99	61
67.10	45.4	61.8	83.70	3.60	41.5	38.00	44
30.80	28.2	88.0	83.68	7.40	27.1	23.60	26
81.00	61.7	69.0	80.70	7.10	55.9	49.79	57
44.20	54.9	30.5	20.10	53.20	13.5	11.03	26
36.70	33.9	28.6	25.72	60.00	10.5	8.72	14
23.70	19.4	65.4	71.64	23.90	15.5	13.90	15
34.00	33.6	96.8	80.94	12.50	32.9	27.20	29
21.70	21.0	77.0	65.60	12.00	16.7	13.78	18
43.70	35.7	76.2	78.42	5.10	33.3	28.00	34
26.00	19.9	68.8	72.16	7.20	17.9	14.36	18
27.60	39.6	62.7	35.10	57.50	17.3	13.90	17
36.10	32.9	77.8	71.12	5.50	28.1	23.40	31

Resultados de PRL inicial, %R de PRL, % macroPRL presente na cromatografia, e estimativa de PRL não-Macro nos ensaios Immulite, Delfia e na cromatografia por filtração em gel. (n: 61 a 88).

PRL inicial		% R de PRL		% macroPRL	Estimativa mPRL		
Immulite	Delfia	Immulite	Delfia	CFG	Immulite	Delfia	CFG
26.30	22.6	79.8	74.68	6.00	21.0	16.88	21
77.10	56.6	64.9	70.66	18.30	50.0	39.99	46
134.00	92.9	65.7	85.46	2.30	88.0	79.39	91
103.00	71.9	65.2	86.22	2.90	67.2	61.99	70
47.30	36.5	64.7	75.06	5.90	30.6	27.40	34
63.20	50.2	68.8	78.08	17.10	43.5	39.20	42
51.30	53.5	30.6	22.16	82.70	15.7	11.86	9
24.30	18.6	69.1	75.80	7.50	16.8	14.10	17
52.90	41.7	74.7	80.56	3.40	39.5	33.59	40
26.10	23.4	33.6	28.46	34.10	8.8	6.66	15
25.90	24.3	82.6	67.80	4.40	21.4	16.48	23
25.40	19.6	70.5	72.04	8.00	17.9	14.12	18
39.10	33.9	73.1	77.28	2.50	28.6	26.20	33
67.80	48.5	65.8	74.22	3.20	44.6	36.00	47
36.60	25.8	68.9	74.40	5.00	25.2	19.20	25
92.30	69.4	68.8	72.62	2.30	63.5	50.40	68
29.00	24.2	82.8	71.80	9.40	24.0	17.38	22
51.10	60.0	25.2	15.20	78.60	12.9	9.12	13
21.50	18.1	64.2	52.58	20.90	13.8	9.52	14
55.00	70.3	15.6	78.22	74.60	8.6	54.99	18
38.10	26.8	60.6	69.24	4.30	23.1	18.56	26
48.40	36.4	67.8	71.96	5.00	32.8	26.19	35
51.60	38.4	68.0	69.26	12.60	35.1	26.60	34
23.40	17.3	60.3	57.22	6.70	14.1	9.90	16
37.70	32.4	70.6	66.66	6.60	26.6	21.60	30
32.30	24.6	75.9	77.14	2.50	24.5	18.98	24
19.90	13.3	62.8	70.82	86.50	12.5	9.42	2
29.50	21.8	59.3	65.96	90.40	17.5	14.38	2