

A pesquisa do vírus do Epstein-Barr (EBV) pela reação de hibridização *in situ* realizada no Núcleo de Patologia Quantitativa – Centro de Patologia – IAL

Study of the Epstein-Barr virus (EBV) by in situ hybridization performed at Laboratory of Quantitative Pathology – Center of Pathology – Adolfo Lutz Institute

Neuza Kasumi Shirata¹; Lidia Midori Kimura¹; Juliana Mariotti Guerra¹; Roberto Antonio Pinto Paes^{II}; Yara Menezes^{II}; Venâncio Avancini Ferreira Alves^{III}; Suely Nonogaki^I

^INúcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz

^{II}Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz

^{III}LIM 14 – Faculdade de Medicina da USP

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar os dados preliminares da detecção do Epstein-Barr Virus (EBV) pela reação de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) nas amostras encaminhadas ao Núcleo de Patologia Quantitativa/Instituto Adolfo Lutz. Os 12 casos com suspeita da presença do EBV foram recebidos no período de outubro de 2011 a julho de 2012, totalizando 14 amostras, sendo que quatro casos apresentavam resultados prévios pelo estudo imuno-histoquímico (IHQ): três negativos e um positivo para o EBV LMP-1. Foi utilizado o Zytostat EBV Probe e o ZytoFast Plus CISH Implementation Kit – HRP – DAB adaptado às condições do laboratório. A positividade para EBER (*Epstein-Barr Encoded Early RNAs*) do EBV foi observada em 10 amostras, inclusive nos três casos previamente negativos pelo exame IHQ. Concluímos, neste estudo preliminar, que a reação de CISH permitiu detectar sequências gênicas do EBV, mesmo em amostras negativas para proteína latente de membrana (LMP-1) pela reação IHQ.

PALAVRAS-CHAVE: Vírus Epstein-Barr. Hibridização *in situ*. Linfoma.

Imuno histoquímica

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze preliminary data from the detection of Epstein-Barr Virus (EBV) by chromogenic hybridization (CISH) performed in samples received by the Laboratory of Quantitative Pathology – Center of Pathology – Adolfo Lutz Institute. Twelve cases suspected to be positive for EBV were received between October, 2011 and July, 2012, totaling 14 samples. Four cases presented previous results by immunohistochemical reaction (IHC): three cases were negative and one was positive for EBV LMP-1. ZytoFast EBV Probe and ZytoFast Plus CISH Implementation kit – HRP-DAB were used and adapted according to our laboratory conditions. Positive results for EBER (Epstein-Barr Encoded Early RNAs) of EBV were observed in 10 samples, including those three negative cases for IHQ. We concluded that CISH reaction allows detection of genic sequences of EBV, even in samples testing negative for membrane latent protein (LMP-1) by IHC reaction.

KEYWORDS: Epstein-Barr Virus. In situ hybridization. Lymphoma. Immunohistochemistry.

O vírus Epstein-Barr (EBV), agente etiológico da mononucleose,¹ foi o primeiro vírus a ser descoberto como oncogênico,² podendo ser associado aos linfomas, destacando-se os de Hodgkin (LH), Burkitt e ao carcinoma indiferenciado da nasofaringe,^{3,5} dentre outros.

O meio de transmissão é principalmente pela saliva. Estudos epidemiológicos estimam que 90% da população humana adulta está infectada pelo EBV, mas a maioria não desenvolverá neoplasias.^{6,7,8}

As técnicas de hibridização *in situ* (ISH) são utilizadas para localizar sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras celulares ou teciduais, sendo apontada como "Gold Standard" na identificação da infecção latente pelo EBV em LH.⁸

A associação do EBV ao LH, sobretudo em pacientes infectados pelo HIV,⁹ eleva os riscos de desenvolvimento de LH na presença do EBV,

com relatos de até 100% de associação em pacientes HIV positivos com LH e EBV.¹⁰ Desta forma, a pesquisa para EBV torna-se particularmente relevante em pacientes soropositivos para HIV, transplantados, recém-nascidos prematuros ou imunossuprimidos.⁹

O Núcleo de Patologia Quantitativa (NPQ) – Centro de Patologia – Instituto Adolfo Lutz (IAL) é responsável pela realização de exames biomoleculares para o diagnóstico de doenças de interesse em Saúde Pública, utilizando a patologia quantitativa e marcadores biológicos/moleculares na investigação de doenças infecciosas e neoplásicas. (Decreto Estadual nº 55.601/2010).

O Laboratório de Imuno-histoquímica (IHQ) do Núcleo de Anatomia Patológica - IAL recebe, para consulta, amostras da Rede SUS, tendo padronizado, dentre outros marcadores, a reação de IHQ para detecção da proteína LMP-1, que é

expressa em algumas fases da infecção por EBV. O NPQ iniciou a padronização da técnica de hibridização *in situ* para o EBV em outubro de 2011, para complementar o atendimento aos casos cujos resultados fossem negativos pela reação IHQ, como por exemplo, linfoma de Burkitt. Nesta fase de validação, o NPQ recebeu amostras de interesse científico envolvendo pacientes HIV positivos e óbitos de pacientes transplantados com suspeita de infecção pelo EBV.

O objetivo deste estudo foi analisar a experiência preliminar para a detecção do vírus Epstein-Barr em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina.

No período de outubro de 2010 a julho de 2012, foram recebidos 12 casos de biópsia ou necrópsia com suspeita da presença do EBV, dois deles com duas amostras, totalizando 14 amostras, que foram fixadas em formalina e incluídas em parafina. As amostras eram originárias de diferentes instituições: FMUSP (05); Emescam – Vitória/ES (02); Hospital Heliópolis (02); Instituto de Infectologia Emílio Ribas (02); CRT-DST/Aids (01), cujas hipóteses diagnósticas encontram-se na Tabela 1. Somente 4/14 (28,6%) apresentavam resultados prévios de reação de IHQ para o EBV, utilizando anticorpo para detecção da proteína latente de membrana (LMP). O número de amostras variou conforme as topografias apresentadas a seguir:

linfonodo (06); fígado (03); reto (01); estômago (01); rinofaringe (01); massa cervical (01) e topografia não referida (01).

Foi utilizado o ZytoFast EBV Probe e o ZytoFast Plus CISH Implementation Kit – HRP-DAB (ZytoVision, Bremerhaven, Alemanha), adaptado às condições do laboratório. As reações foram executadas com controles negativo e positivo, sendo o controle positivo amostra previamente analisada pela imuno-histoquímica. As amostras positivas apresentaram coloração nuclear marrom dourada.

Essa metodologia para detecção do EBV foi realizada em amostras provenientes de blocos de inclusão em parafina, armazenadas no arquivo de laboratório, com laudos liberados anteriormente. Por se tratar de um estudo retrospectivo com amostras de arquivo, justificamos a impossibilidade de obtenção do TCLE.

A positividade para EBER do EBV foi observada em 10/12 (83,3%) casos pela ISH. Foram recebidos sete casos com hipótese diagnóstica inicial de linfoma e, dentre eles, foi observado positividade em 6/7 (85,7%). Em dois casos foram recebidas duas amostras, sendo que um deles demonstrou positividade em ambos (linfonodo e fígado) (caso 4 da Tabela 2), enquanto no outro foi observada positividade em apenas um dos blocos de linfonodos (caso 1 da Tabela 2) (Figura 1).

Tabela 1. Distribuição da hipótese diagnóstica inicial das amostras recebidas pelo Centro de Patologia, outubro de 2010 a julho de 2012

Diagnóstico inicial	Nº de casos
Linfoma	7
Hepatite pós-transplante	2
Processo inflamatório crônico ulcerado	1
Carcinoma medular com múltiplos focos de neoplasia neuroendócrina	1
Linfoepitelioma	1
TOTAL	12

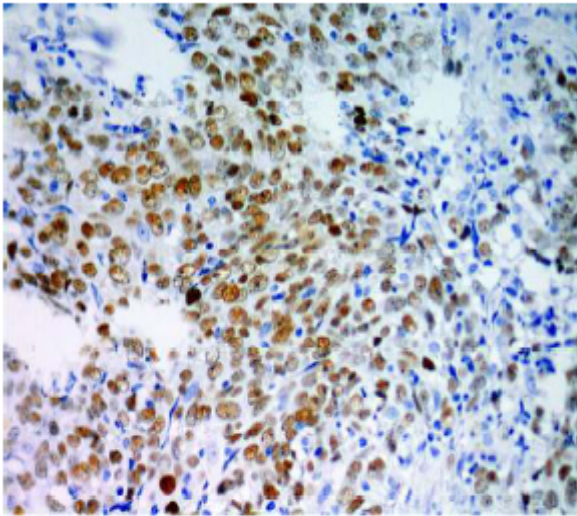


Figura 1. CISH – EBV-EBER positivo na amostra 12

Em relação aos quatro casos que apresentavam resultados prévios pela reação de IHQ para o EBV LMP-1, um deles teve a positividade confirmada, e os outros três casos, inicialmente negativos, demonstraram a presença do EBV pela hibridização *in situ*, conforme apresentado na Tabela 2.

CONCLUSÃO

Nesta análise preliminar, observamos positividade em 83,3% dos casos, mostrando a importância da utilização de técnicas moleculares mais sensíveis para o diagnóstico de agentes etiológicos virais como o EBV.

Devemos verificar que, no caso 1 deste estudo, com duas amostras, a positividade foi encontrada somente em uma delas, sendo que a principal hipótese a ser considerada nessa situação é de falha na fase pré-analítica, isto é, na fixação e processamento da amostra. A má qualidade do fixador não tamponado com sais de fosfato; tempo excessivo ou insuficiente de fixação; recipiente inadequado para fixação; volume insuficiente do fixador; entre outros fatores, podem interferir tanto no diagnóstico como na pesquisa em patologia molecular.

Tabela 2. Distribuição das amostras segundo topografias e sua correlação com os diagnósticos de IHQ e CISH

Nº do Caso	Topografias	RESULTADOS	
		IHQ EBV - LMP-1	CISH EBV - EBER
1	Linfonodo axilar	-	positivo
	Linfonodo axilar	-	negativo
2	Fígado	negativo	positivo
3	Linfonodo	-	positivo
4	Linfonodo	negativo	positivo
	Fígado	negativo	positivo
5	Não referida	-	positivo
6	Massa cervical	-	positivo
7	Reto	negativo	positivo
8	Linfonodo cervical	positivo	positivo
9	Fígado	-	negativo
10	Estômago	-	negativo
11	Rinofaringe	-	positivo
12	Linfonodo cervical	-	Positivo

IHQ – imuno-histoquímica; EBV – vírus Epstein-Barr; LMP – proteína latente de membrana; CISH – hibridização *in situ* cromogênica; EBER – (Epstein Barr Encoded Early RNAs)

Essa metodologia para a detecção do EBV, em fase de validação no NPQ, já traz dados promissores, por meio da detecção de sequências gênicas de vírus Epstein-Barr em casos sem expressão imuno-histoquímica da proteína viral LMP.

A implantação dessa metodologia para o estudo do EBV em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina viabilizará o desenvolvimento de futuros estudos para identificação de outros agentes infecciosos e contribuir assim na rotina diagnóstica e também na pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Henle, G; Henle, W; Diehl, V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Nat Acad Sc.* 1968; 59(1):94-101.
2. Epstein, MA; Achong, BG; Barr, YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet.* 1964; 283:702-3.
3. Munch, M. Epstein-Barr virus strain characterization. *APMIS.* 1968; 106:425-33.
4. Peh, SC; Kim, LH; Mun, KS; Tan, EL; Sam, CK; Poppema, S. Epstein-Barr virus (EBV) subtypes and variants in malignant tissue from Malaysian patients. *J Clin Exp Hematopathol.* 2003; 43(2):61-9.
5. Banerjee, D. Recent advances in the pathobiology of Hodgkin's lymphoma: potential impact on diagnostic, predictive, and therapeutic strategies. *Adv Hematol.* 2011; 2011:439-56.
6. Henle, G; Henle, W; Clifford, P; Diehl, V; Kafuko, GW; Kirya, BG *et al.* Antibodies to EB virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Nat Cancer Inst.* 1969; 43:1147-57.
7. Lima, MA; Rabenhorst, SH. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. *Rev Bras Cancel.* 2006; 52(1):87-96.
8. Gulley, ML; Tang, W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *Review. J Mol Diagn.* 2008; 10:279-92.
8. Biggar, RJ; Jaffe, ES; Goedert, JJ; Chaturvedi, A; Pfeiffer, R; Engels, EA. Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/Aids. *Blood.* 2006; 108(12):3786-91.
10. Mani, H; Jaffe, ES. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with newer insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009; 9(3):206-16.

Correspondência/Correspondence to

Neuza Kasumi Shirata
Núcleo de Patologia Quantitativa – Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz
Avenida Doutor Arnaldo nº 355 – 7º andar – Laboratório 705 – Cerqueira César – CEP 01246-902, São Paulo/SP
Tel.: 11 3068-2874, fax 11 3068-2871
E-mail: nkshirata@gmail.com