

LIA KARINA VOLPATO

**DETERMINAÇÃO DA MATURAÇÃO PULMONAR FETAL
PELA CONTAGEM DE CORPUSCÚLOS LAMELARES NO
LÍQUIDO AMNIÓTICO**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a conclusão
no Curso de Graduação em Medicina

FLORIANÓPOLIS

1998

Apr. 9,5
Tr 5 - 9,0
9,25
Edson
23/11/98

LIA KARINA VOLPATO

**DETERMINAÇÃO DA MATURAÇÃO PULMONAR FETAL
PELA CONTAGEM DE CORPUSCÚLOS LAMELARES NO
LÍQUIDO AMNIÓTICO**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a conclusão
no Curso de Graduação em Medicina.**

Chefe do Colegiado de Medicina: Edson José Cardoso

Orientador: Beatriz Maikot Kuerten Gil

Co - Orientador: Adriana Toledo

FLORIANÓPOLIS

1998

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Aos amigos, em especial à Tatiane Cardoso Motta, por compartilhar as horas de angústia e incertezas.

À Beatriz Maikot Kuerten Gil, pela idealização do projeto e orientação.

À Adriana Toledo, pelo incentivo e orientação na conclusão do estudo.

À Suely Terezinha Steinwandter, bioquímica do Hospital Universitário, pelo interesse e execução dos testes.

Aos obstetras e funcionários do Centro Obstétrico do Hospital Universitário, por coletarem e armazenarem o material utilizado neste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboram com esta pesquisa.

E, por fim, as gestantes e recém nascidos, pois sem eles este estudo não teria sentido.

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Objetivo	3
3. Método.	4
4. Resultados.	7
5. Discussão.	15
6. Conclusão.	19
7. Referências.	20
Resumo.	23
Summary.	24
Apêndice.	25

1. INTRODUÇÃO

Em várias situações obstétricas, como nos casos de amniorexis prematura, doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG), placenta prévia, gemelaridade, Isoimunização Rh, *Diabetes mellitus* gestacional, retardo do crescimento intra-uterino (RCIU), entre outras, o nascimento de um feto prematuro é inevitável, e em alguns casos desejável^{1,2}. Contudo, a decisão pela interrupção eletiva da gestação, deve considerar os benefícios maternos proporcionados pela mesma e os riscos neonatais da prematuridade para o feto, fazendo-se um balanço custo-benefício desta atitude³.

É bem estabelecido que a causa mais comum da morbi-mortalidade neonatal é a prematuridade, e a principal consequência da imaturidade fetal é a Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém Nascido (RDS)^{3,4,5}, que ocorre em consequência à deficiência de surfactante pulmonar^{4,6}. Assim, um importante pré-requisito para o manuseio de gestações com alto risco de nascimento prematuro é a determinação da maturidade pulmonar fetal^{5,7}.

Muitos métodos bioquímicos têm sido usados para determinar a maturidade pulmonar fetal, entre eles a determinação da relação entre Lecitina e Esfingomielina (relação L/E), desenvolvida inicialmente por Gluck, que é o método mais aceito^{4,7,8} e a determinação do Fosfatidilglicerol (PG)^{4,8}, que são métodos seguros, de alta sensibilidade e especificidade, porém de custo elevado, demorados e de técnica complexa^{3,4,7,9}. Outro método bastante utilizado é o "Shake Test", desenvolvido por Clements, de baixo custo, de rápida e simples execução^{3,4,9}; porém sua principal desvantagem é ter seu valor preditivo questionável quando o resultado é intermediário ou negativo^{4,9}. Essas mesmas características são compartilhadas pelo TAP Test, descrito por Socol^{4,9}.

Em 1989, Dubin quantificou o número de corpúsculos lamelares (LB) no líquido amniótico¹⁰. Corpúsculos lamelares (LB) são partículas laminadas encontradas no epitélio das células alveolares tipo II, que contém grande parte dos fosfolipídios que compõem o surfactante pulmonar^{11,12}. Com a maturação pulmonar fetal os LB são secretados no espaço alveolar e passam para o líquido amniótico (LA), onde se acumulam com a progressão da gestação^{9,7}.

O método de contagem de corpúsculos lamelares é realizado através da análise do LA por aparelhos de contagem celular (counters) disponíveis comercialmente¹⁰. Esses aparelhos diluem a amostra a ser analisada em uma solução eletrolítica, e uma pequena quantidade, geralmente 0,5 ml, desta solução é sugada através de uma abertura de aproximadamente 100 µm de diâmetro. Uma corrente elétrica constante é estabelecida entre os eletrodos presentes em cada lado da abertura; qualquer partícula que entre na área de abertura exclui os eletrólitos, a resistência entre os eletrodos aumenta e a voltagem resultante pode ser quantificada e medida. A amplitude do pulso é proporcional ao volume deslocado pela partícula^{6,10,13}.

Como os corpúsculos lamelares e plaquetas são indistinguíveis entre si pelo aparelho, o número de LB é obtido através da análise da amostra de líquido amniótico pelo “counter” e reportados pelo canal plaquetário (2-20 fl.)^{5,7,10}.

A partir da descrição deste método por Dubin¹⁰, vários estudos foram realizados, demonstrando importante correlação entre a contagem de LB e outros métodos utilizados na predição da maturidade pulmonar fetal, entre eles a relação L/E^{2,5,6,10,13,14,15}.

Desta forma, vários autores sugerem que a determinação do número de corpúsculos lamelares seja utilizado como um teste de primeira linha na predição da maturidade pulmonar fetal^{10,15}.

2. OBJETIVO

Analisar a reprodutibilidade e confiabilidade do método, ou seja, a quantificação de corpúsculos lamelares presentes no líquido amniótico por aparelhos de contagem celular, na determinação da maturidade pulmonar fetal em nosso meio.

3. MÉTODO

No período de março à outubro de 1998 fez-se um estudo prospectivo, ^e descritivo e analítico, onde analisou-se amostras de líquido amniótico (LA), obtidas de cesarianas realizadas na Maternidade do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina – HU/UFSC, Florianópolis - SC.

O grupo de estudo incluiu amostras de líquido amniótico de 43 gestantes que constituíam uma população heterogênea, caracterizada pelas seguintes variáveis: idade materna entre 16 e 36 anos; brancas e negras; idade gestacional - estabelecida pela data da última menstruação (DUM) – compreendida entre 32 e 42 semanas. Nos casos em que houve desenvolvimento de patologias obstétricas observou-se: doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG), *Diabetes mellitus* gestacional (DMG), amniorrexis prematura, trabalho de parto prematuro polidrâmnio e oligodrâmnio. Das gestantes que apresentaram patologias prévias, uma era hipertensa crônica, uma diabética tipo II que fazia uso regular de insulina e outra sofreu um acidente vascular cerebral (AVC) no último trimestre da gestação. Apenas uma não fez acompanhamento pré-natal. Em quatro ocasiões fez-se uso de corticoesteróide antes da interrupção da gestação. Em nenhum caso foi realizado outro método para avaliar a maturidade pulmonar fetal.

As amostras eram colhidas imediatamente após a incisão uterina, em seringas plásticas de 10 ou 20 ml, sendo armazenadas em geladeira à 4° C por até 4 dias antes da análise laboratorial.

Das 43 amostras coletadas, nove foram desprezadas por haver contaminação com sangue, sendo utilizadas no presente estudo as 34 restantes.

O LA coletado era centrifugado por 3 minutos à 2.000 rpm (aproximadamente 500 x g) para remover os restos celulares. O sobrenadante era

processado em um aparelho de contagem celular (COULTER® 890); a quantificação dos corpúsculos lamelares (LB) era feita usando-se como parâmetro o tamanho usado para a contagem plaquetária, ou seja, abertura entre 2 e 20 fl. Cada amostra foi analisada duas vezes consecutivas e a média das determinações utilizada como resultado.

A idade gestacional (IG) do recém nascido era determinada pelo exame físico com a determinação do Capurro Somático pelo neonatologista.

Fez-se uma estratificação da idade gestacional determinada pelo Capurro, conforme a Classificação de Prematuridade reconhecida pela Organização Mundial de Saúde, em:

1. **Prematuridade extrema** se idade gestacional menor que 30 semanas e 6 dias;
1. **Moderadamente prematuro** se idade gestacional entre 31 semanas e 34 semanas e 6 dias;
2. **Prematuridade limítrofe** se idade gestacional entre 35 semanas e 36 semanas e 6 dias;
3. **Termo** se idade gestacional entre 37 semanas e 41 semanas e 6 dias;¹⁶

O diagnóstico da Síndrome da Angústia Respiratória do Recém Nascido (RDS) foi baseado nos seguintes critérios:

1. Manifestação clínica de desconforto respiratório (taquipnéia, gemência, tiragens intercostais, batimento de asa de nariz);
2. Evidências radiológicas (padrão reticulogranular fino do parênquima e broncogramas aéreos ou opacidade);
3. Necessidade do oxigenoterapia por um período prolongado (maior que 48 horas);¹⁷

Os casos diagnosticados como taquipnéia transitória não foram considerados como RDS.

Os dados referentes à mãe e ao recém nato foram coletados dos prontuários médicos dos mesmos, após a alta de ambos.

A determinação do Teste Diagnóstico, ou seja, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), e valor preditivo negativo (VPN), foi realizada com três níveis de corte (10.000, 26.000, 30.000 células / μ l) considerando-se valores positivos (para imaturidade pulmonar fetal) os resultados situados abaixo destes níveis.

Os dados foram digitados e analisados no programa Epi Info versão 6a.

4. RESULTADOS

No período março a outubro de 1998 foram coletadas 43 amostras de líquido amniótico, destas 34 foram analisadas neste estudo.

A idade materna ficou compreendida entre 16 e 36 anos. A faixa etária mais freqüente foi de 20 a 29 anos (64,7%). (FIGURA 1)

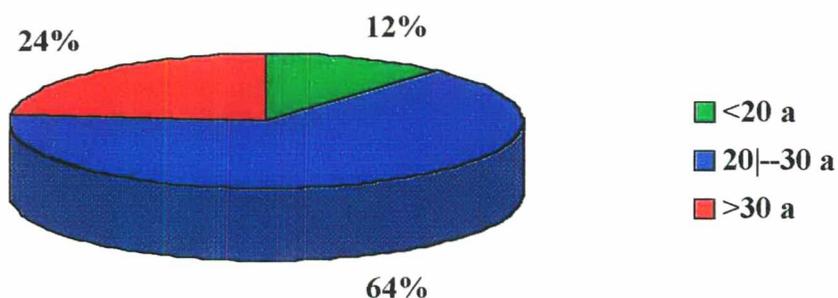


FIGURA 1 : Distribuição da idade materna, em percentual, na população de estudo. HU, 1998.

A maioria das mulheres eram caucasianas (94,1%), sendo apenas duas (5,9%) da raça negra.

A idade gestacional pela última menstruação (DUM) variou de 32 a 42 semanas (FIGURA 2), sendo que a maior incidência foi em 39 semanas. Observou-se que 55,8 % das amostras eram de gestações a termo, 29,4% de gestações pré - termo e 14,7% de gestações “pós – termo”(42 semanas ou mais).

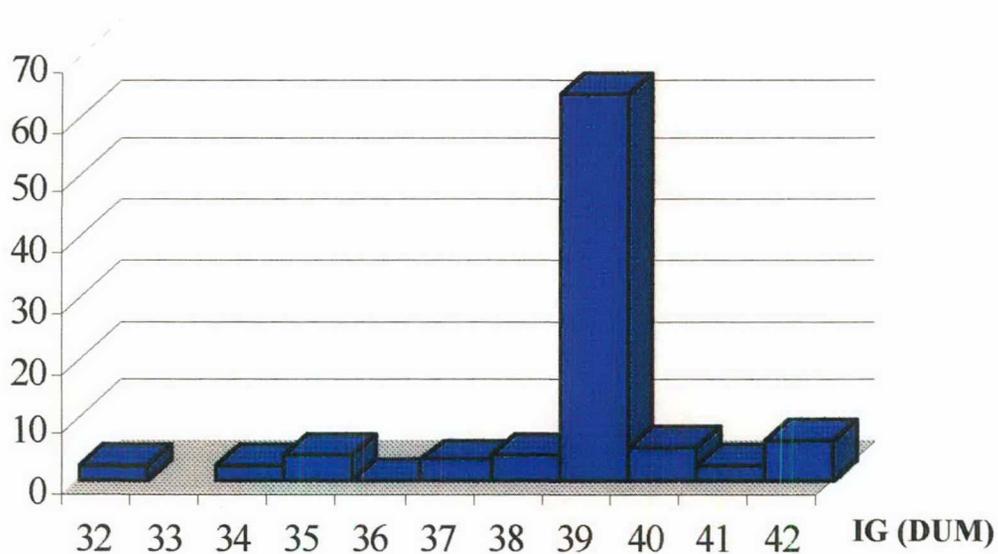


FIGURA 2: Distribuição da Idade Gestacional determinada pela DUM, no momento da cesariana, em percentual, na população estudada. HU, 1998.

Das gestantes analisadas 26,5% eram primigestas, 47% encontravam-se na segunda gestação e 26,5% tinham dois ou mais filhos (FIGURA 3).

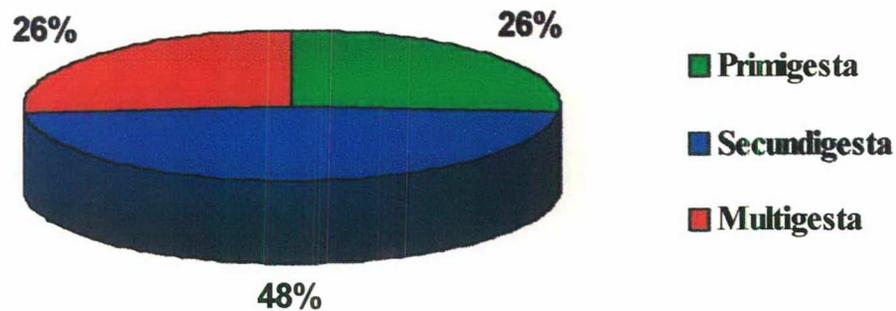


FIGURA 3 : Distribuição do número de gestações, em percentual, na população de estudo. HU, 1998.

Com relação a intercorrências na gravidez, 32,4% desenvolveram alguma patologia obstétrica (TABELA I) , 14,7% utilizaram corticoesteróide antes da interrupção da gestação e 8,8 % tinham doenças prévias à gestação (TABELA II).

TABELA I : Distribuição das intercorrências obstétricas observadas durante a gestação, em número e percentual, na população de estudo. HU, 1998.

<i>Patologias Obstétricas</i>	<i>N^o</i>	<i>%</i>
Trabalho de parto prematuro	3	8.8
Pré-eclampsia	2	5.9
Amniorexis prematura	2	5.9
Amniorexis prematura / Pré-eclampsia	1	2.9
Diabetes Mellitus Gestacional / Pré-eclampsia	1	2.9
Polidramnio / Pré-eclampsia	1	2.9
Oligodramnio	1	2.9
Nenhuma	23	67.7
TOTAL	34	100

TABELA II: Distribuição das patologias maternas prévias à gestação, em número e percentual, na população de estudo. HU, 1998.

<i>Patologias Prévias</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Acidente Vascular Cerebral	1	2.9
Hipertensão Crônica	1	2.9
Diabetes mellitus II	1	2.9
Nenhuma	31	91.2
Total	34	100

Apenas uma gestante (2,9%) não fez acompanhamento pré-natal; em nenhum dos casos foi utilizado outro teste com o intuito de determinar a maturidade fetal.

A quantificação dos Corpúsculos Lamelares (LB) variou de 1.500 a 200.000 células/ μ l (média de 64.735/ μ l). Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém Nascido (RDS) foi diagnosticada em 11.8 % dos casos. O número de corpúsculo lamelares no caso de RDS foi de 24.500/ μ l ou menos. A correlação entre o número de corpúsculos lamelares e a incidência de RDS foi avaliada na FIGURA 4. O Teste do qui quadrado (χ^2) foi de 21.6, onde observou-se importante significancia estatística ($p > 0.0001$).

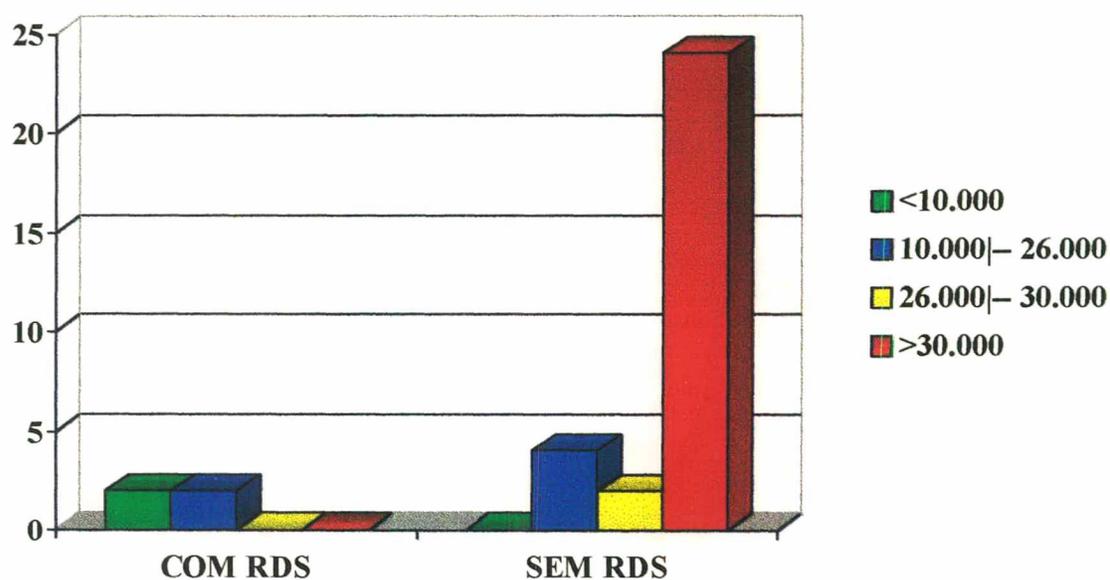


FIGURA 4: Correlação entre o número de LB e a incidência de RDS, em número, na população de estudo. HU, 1998.

A relação entre o número de corpúsculos lamelares (LB), a idade gestacional determinada pelo Capurro e a incidência da Síndrome do Desconforto Respiratório (RDS) foi analisada na FIGURA 5. Observou-se que todos os casos de RDS ocorreram antes de 36 semanas e com contagem de LB menores que 26.000/ μ l.

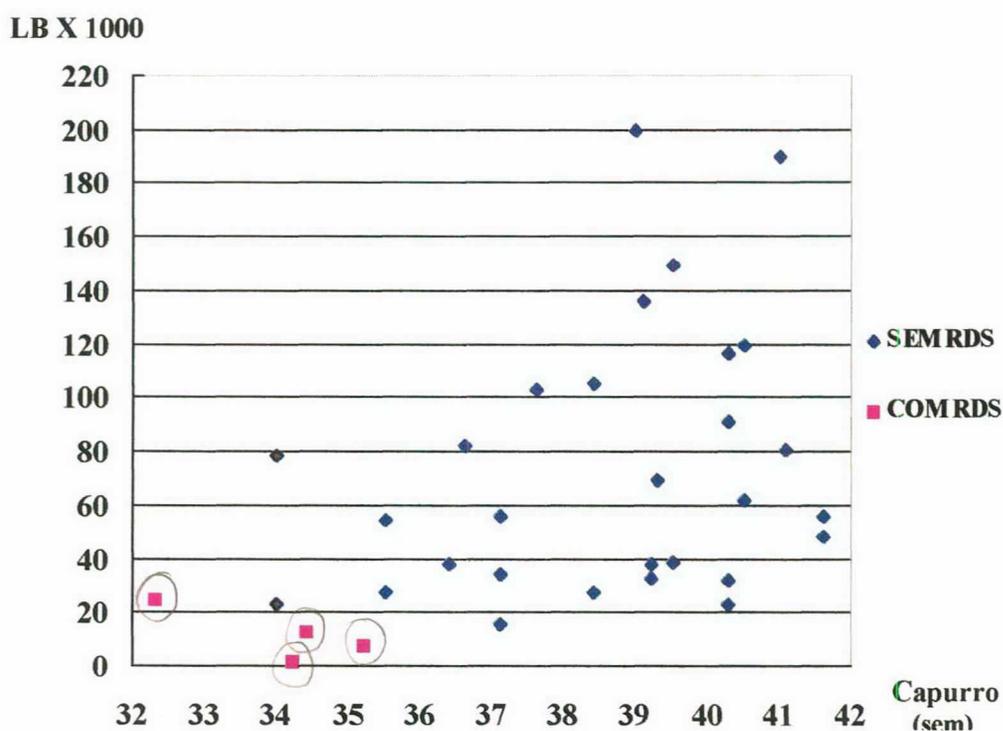
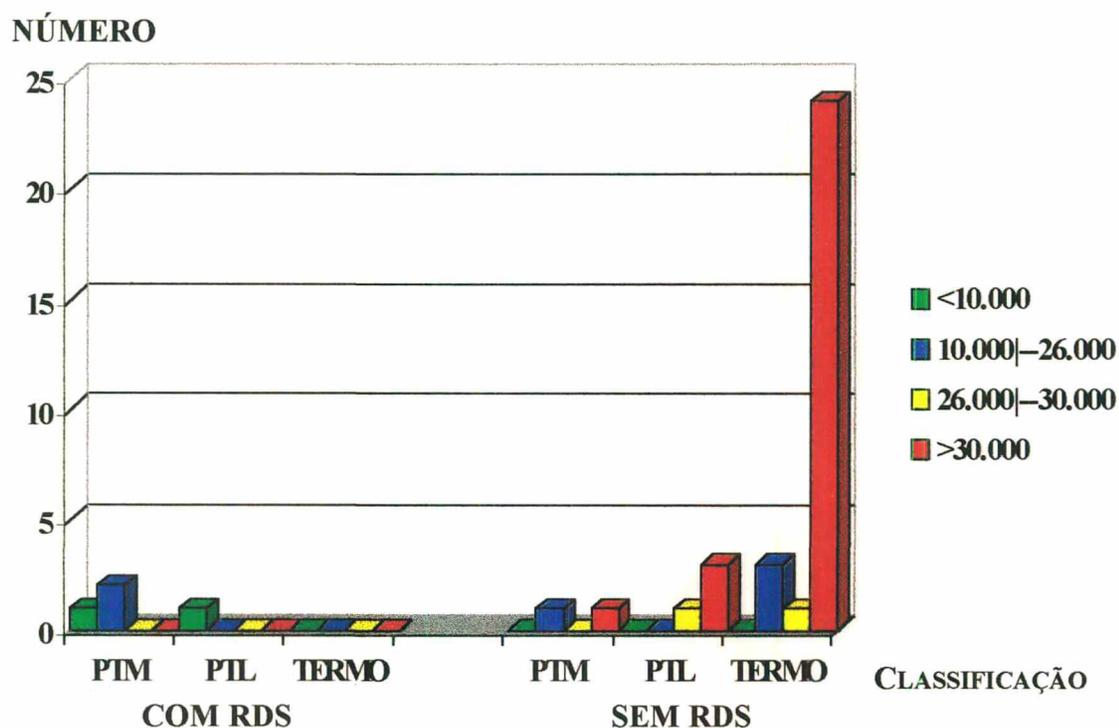


FIGURA 5: Gráfico de dispersão relacionando IG determinada pelo Capurro Somático, número de LB, e a incidência de RDS na população de estudo. HU, 1998.

A correlação entre o número de Corpúsculos Lamelares e a incidência de RDS estratificados em Moderadamente Prematuro (PTM), Prematuridade Limitrofe (PTL) e Termo, foi visualizada na FIGURA 6.



e
 FIGURA 6: Correlação entre o número de LB e a incidência de RDS, estratificada de acordo com a Classificação de Prematuridade preconizada pela OMS, em número, na população estudada. HU, 1998.

Para o cálculo dos testes diagnósticos foram estabelecidos vários valores de corte. Quando usou-se valores menores que 30.000 / μl para indicar imaturidade, o método previu todos os casos da Síndrome do Desconforto Respiratório, sem nenhum falso negativo (sensibilidade e VPN de 100%), contudo resultou em 2 falsos positivos (especificidade de 80% e VPP de 40%). Utilizando-se um corte em 26.000/ μl para prever a imaturidade pulmonar fetal o número de falsos positivos diminuiu de 2 para 1 caso, isto resultou em um aumento da especificidade de 80 para 86% e do VPP de 40 para 50%, enquanto a sensibilidade e o VPN permaneceram inalterados (100%). Considerando-se 10.000 como valor limítrofe, nenhum falso positivo foi observado, aumentando a especificidade e o VPP para 100%, porém houve um decréscimo da sensibilidade e do VPN para 50% e 93%, respectivamente.

A TABELA III resume a correlação entre o número de Corpúsculos Lamelares e o Teste Diagnóstico, ou seja, sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do método.

TABELA III: Correlação entre o número de Corpúsculos Lamelares no líquido amniótico e o Teste Diagnóstico da população estudada. HU, 1998.

<i>Valor de corte (LB/μL)</i>	<i>Sensibilidade %</i>	<i>Especificidade %</i>	<i>VPP %</i>	<i>VPN %</i>
10.000	50	100	100	93
26.000	100	86	50	100
30.000	100	80	40	100

São poucos os estudos a respeito do método na literatura internacional, e a maioria compara os resultados deste teste com a presença de Fosfatidilglicerol e a relação L/E.^{2,5,6,10,13,14,15}

Em 1989, Dubin¹⁰, descreveu o método, determinando como critério o corte em 26.000 LB/ μ l em líquido amniótico centrifugado (500g por 5 minutos) e em 40.000 LB/ μ l em material não centrifugado, considerando resultado positivo quando o número de corpúsculos lamelares estivesse abaixo destes valores. O corte foi determinado em comparação com a relação L/E e Fosfatidilglicerol. O estudo mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 69% em ambas as situações. Os resultados foram vistos como preliminares, uma vez que dos 241 pacientes do estudo apenas três desenvolveram RDS.

Ashwood et al¹³, 1990, também demonstraram que a contagem de LB possuía boa correlação entre o resultado numérico da relação L/E, porém não correlacionaram os resultados com a evolução do Recém Nascido.

Bowie et al¹⁴, 1993, também usando material centrifugado (1000g por 5 minutos), analisaram 50 amostras de líquido amniótico e sugeriram vários valores de corte, classificando em baixo risco de RDS se o número de LB fosse maior que 30.000 LB/ μ l, com valor preditivo positivo e negativo de 26,6% e 100%, respectivamente; e em alto risco se concentração menor que 10.000 LB/ μ l com valor preditivo positivo de 63.6% e negativo de 97.8%; os valores situados entre estes dois grupos foram considerados de grupo intermediário.

Em 1994, Fakhoury et al⁶, analisaram 28 amostras, centrifugadas a 500g por 3 minutos, determinando como nível de corte 30.000 partículas / μ l, obtendo sensibilidade e especificidade de 100% e comparando seus achados com a relação L/E.

Em 1995, Dalence et al⁵, analisando 130 amostras, centrifugadas a 276g por 5 minutos, determinaram, da mesma forma que Bowie et al¹⁴, vários níveis de

corte, considerando valores superiores a 30.000 LB/ μ l como baixo risco, com sensibilidade e valor preditivo negativo (VPN) de 100%, porém especificidade de apenas 64% e valor preditivo positivo de 28% , e de alto risco com valores inferiores a 10.000 LB/ μ l, obtendo baixa sensibilidade e VPN (75% e 20% respectivamente) porém boa especificidade (95%) e VPP (67%). Seus resultados foram comparáveis a relação L/E.

Outros trabalhos foram realizados com amostras não centrifugadas, com sensibilidade, especificidade, VPP e VPN semelhantes, porém com níveis de corte mais elevados, e por este motivo não serão aqui discutidos.^{2, 15,21}

Analisando os resultados encontrados em nosso estudo, a sensibilidade observada (100% para cortes em 30.000 e 26.000 LB/ μ l e 50% para cortes em 10.000 LB/ μ l) indica a capacidade do teste em identificar indivíduos com imaturidade, enquanto o VPP (40%, 50% e 100% para os valores de corte supracitados, respectivamente), nos informa quantos destes realmente vão apresentá-la. Por outro lado a especificidade, que nos dá a capacidade do método em encontrar fetos com maturação pulmonar fetal, foi de 80%, 86% e 100% nos três cortes , nesta ordem. Porém, ante a necessidade clínica de estabelecer a estado da maturação pulmonar do feto, consideramos que o resultado mais relevante seja o VPN, que indica quantos dos pacientes identificados como maduros realmente o eram, sendo de 100% para cortes de 30.000 e 26.000 LB/ μ l e 93% quando o corte ocorria em 10.000 LB/ μ l.

Comparando-se nossos resultados com a literatura internacional, observamos que em cortes realizados em 30.000 LB/ μ l a sensibilidade e o VPN são semelhantes aos diversos estudos realizados, porém a especificidade e VPP foram maiores que nos estudos realizados por Dalence et al⁵ e Bowie et al¹⁴ (provavelmente pela pequena amostra e diferenças no método de centrifugação), e menores que os encontrados por Fakhoury et al⁶.

No corte realizado com 26.000 LB/ μ l a sensibilidade e VPN foram iguais aos achados de Dubin¹⁰ e Bowie et al¹⁴, enquanto a especificidade e o VPP foram maiores que as encontradas por estes autores.

Comparando-se o corte realizado em 10.000 LB/ μ l observamos sensibilidade e VPN menores que os encontrados por Dalence et al⁵ e Bowie et al¹⁴, mas a especificidade e VPP foram superiores, possivelmente pelos mesmos motivos suspeitados quando o corte foi realizado em 30.000 LB/ μ l.

Com esse dado poderíamos considerar, assim como Bowie et al¹⁴ e Dalence et al⁵, alto risco para desenvolver Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém Nascido se valores inferiores a 10.000 LB/ μ l e baixo risco se valores acima de 30.000 LB/ μ l ou 26.000 LB/ μ l como prefere Dubin¹⁰. Vale ressaltar que no corte sugerido por Dubin o número de falso positivos foi menor.

Não observamos uma relação direta entre a idade gestacional e o número de Corpúsculos Lamelares, o que vem de encontro ao fato da maturidade pulmonar ser afetada não apenas pela progressão da gestação, mas outros fatores como patologias maternas, uso de algumas substâncias (medicamentos ou não) durante a gestação e sofrimento fetal, entre outras^{3,18}.

Porém, deve – se ressaltar que esta avaliação é muito superficial, uma vez que quando realizamos uma análise estratificada por idade gestacional, a amostra foi deveras pequena para que pudéssemos afirmar com convicção os resultados acima obtidos.

Uma das vantagens deste teste é que a quantidade de líquido requerido é muito pequena^{6,12,21}. A quantidade necessária para a análise do líquido amniótico (LA) neste estudo foi de 1 ml para cada caso, uma vez que realizávamos duas verificações cada amostra, o que permite que praticamente qualquer quantidade de LA coletado seja suficiente.

6. CONCLUSÃO

O método de contagem de corpúsculos lamelares no Líquido Amniótico é um teste que pode ser reproduzido facilmente em qualquer hospital ou laboratório que disponha de um aparelho de contagem celular. Necessita muito pouco material e sua realização requer pouco tempo, sendo sua técnica fácil e simples de ser executada e seu custo muito baixo, fatos que o torna muito conveniente em nosso meio.

Infelizmente, pelo pequeno número de amostras, não podemos confirmar sua confiabilidade. Os resultados encontrados sugerem tratar-se de um método com alta sensibilidade e boa especificidade, porém acreditamos que mais estudos devam ser realizados, tendo-se como alvo a população de maior risco de imaturidade pulmonar fetal, ou seja, recém nascidos com prematuridade extrema e os moderadamente prematuros, antes que qualquer afirmação a esse respeito seja feita.

7. REFERÊNCIAS

1. Cosmi EV, Di Renzo GC. Assessment of foetal lung maturity. *Eur Respir J*, 1989; 2 (Supl SUP 3): 40-9.
2. Ashwood ER, Palmer SE, Taylor JS, Pingree SS. Lamellar body counts for rapid fetal lung maturity testing. *Obstet Gynecol* 1993; 81 (4): 619-24. ☒
3. Zugaib M. Profilaxia da Síndrome de Angústia Respiratória. *Gin Obst Bras* 1981; 4 (1): 19-35. ☐
4. Rodriguez-Macías KA. A comparison of three tests for determining fetal pulmonary maturity. *Int J Gynaecol Obstet* 1991; 51: 39-42. ☒ |
5. Dalence CR, Bowie LJ, Dohnal JC, Farrell E, Neerhof MG. Amniotic fluid lamellar body count: a rapid and reliable fetal lung maturity test. *Obstet Gynecol* 1995; 86 (2): 235-9. ☐
6. Fakhoury G, Daikoku NH, Benser J, Dubin NH. Lamellar body concentrations and the prediction of fetal pulmonary maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170 (1): 72-6. ☐
7. ACOG educational bulletin. Assessment of fetal lung maturity. *Int J Gynaecol Obstet* 1997; 56: 191-8. ☐
8. Ruiz-Budría J, Fabre-González E, Higuera MT, Serrano-Ostáriz JL. Amniotic fluid phospholipids: new predictive values of L/S and PG/S ratios. *Rev Esp Fisiol* 1995; 51 (1): 17-22. ☐
9. Field NT, Gilbert WM. Current Status of amniotic fluid tests on fetal maturity. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40 (2): 366-86. ☐
10. Dubin SB. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship measures of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1989; 35 (4): 612-2. ☐

11. Ouloton M, Martin TR, Faulkner GT, Stinson D, Johnson JP. Developmental study of a lamellar body fraction isolated from human amniotic fluid. *Pediatr Res* 1980; 14 (5): 722-8. |
12. Hook GER, Gilmore LB, Trombopoulos EG, Fabro SE. Fetal lung lamellar bodies in human amniotic fluid. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117 (3): 541-50. ▮
13. Ashwood ER, Oldroyd RG, Palmer SE. Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 1990; 75 (2) 289-92. □
14. Bowie LJ, Shammo J, Dohnal JC, Farrell E, Vye MV. Lamellar body number density and the prediction of respiratory distress. *Am J Clin Pathol* 1991; 95 (6) 781-6. |
- * 15. Grenspon JS, Rosen DJD, Roll K, Dubin SB. Evaluation of lamellar body number density as the initial assessment in a fetal lung maturity test cascade. *J Reprod Med* 1995; 40 (4): 260-6. ▮
16. Kliegman RM. Distúrbios do trato respiratório. In: Nelson EW, *Tratado de Pediatria*. 15ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997 p. 554-70.
17. Leone RC, Ramos JLA, Vaz FAC. O recém-nascido pré-termo. In: Marcondes E, *Pediatria Básica*, 8ed. São Paulo: Sarvier; 1994 p. 333-8.
18. Spillman T, Cotton DB. Current perspectives in assessment of fetal pulmonary surfactant status with amniotic fluid. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27 (4): 341-89. ▮
19. Duck-Chong CG. The isolation of lamellar bodies and their membranous content from rat lung, lamb tracheal fluid and human amniotic fluid. *Life Sci* 1978; 22 (22): 2025-30.
20. Sanders RL, Hassett RJ, Vatter AE. Isolation of lung lamellar bodies and their conversion to tubular myelin figures in vitro. *Anat Rec* 1980; 198 (3): 485-501.

21. Carrillo JB, Garcia EA, Lozano CG, Galache PV, Lozano JLG, Gonzales HL. Cuantificación de cuerpos lamelares en líquido amniótico: método de valoración de madurez pulmonar fetal. Ginec Obst Mex 1997; 65 (mayo): 202-6.

RESUMO

Objetivo: Analisar a reprodutibilidade e confiabilidade do método na determinação da maturidade pulmonar fetal.

Método: Obteve-se 34 amostras de líquido amniótico em diferentes idades gestacionais (32 a 42 semanas), coletadas de cesarianas logo após a incisão uterina. O número de corpúsculos lamelares (LB) foi quantificado em um aparelho de contagem celular (COULTER® 890) após centrifugação, a 500g por 3 minutos. Três níveis de corte foram utilizados (10.000, 26.000 e 30.000 LB/ μ l). Os resultados foram comparados com a evolução neonatal estabelecendo-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).

Resultados: Todos os quatro casos de Síndrome do Desconforto Respiratório ocorreram com menos de 36 semanas de gestação e contagem de LB inferior a 26.000/ μ l. A sensibilidade e VPN foram de 100% para cortes em 26.000 e 30.000/ μ l , sendo de ^{Sensib}50% e ^{VPN}93% para cortes em 10.000/ μ l, respectivamente , enquanto a especificidade foi de 100% se o corte fosse feito em 10.000/ μ l, 86% se em 26.000/ μ l e 80% se em 30.000/ μ l. Com relação ao VPP os resultados foram de 100%, 50% e 40% para cortes realizados em 10.000/ μ l, 26.000 e 30.000/ μ l, nesta ordem.

Conclusão: Trata-se de um método facilmente realizável em qualquer local que disponha de um aparelho de contagem celular, e, aparentemente, com boa sensibilidade, especificidade, VPP e principalmente VPN.

SUMMARY

Objective: To analyze method reproducibility and reliability for the determination of fetal lung maturity.

Method: 34 samples of amniotic fluid were obtained at different gestational ages (32 to 42 weeks), collected in Cesareans, soon after uterine incision. The number of lamellar bodies (LB) was quantified through an electronic cell counter (COULTER® 890) after centrifugation at 500 g, during 3 minutes. Three cutoff levels were used (10,000, 26,000, and 30,000 LB/ μ l). The results were compared to the neonatal evolution, in order to establish method sensibility, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV).

Results: All the four cases of Respiratory Distress Syndrome happened at less than 36 weeks of gestation and LB counting below 26,000/ μ l. Sensibility and NPV were 100% for cutoffs at 26,000 and 30,000/ μ l, and 50% and 93%, respectively, for cutoffs at 10,000/ μ l, while specificity was 100% when the cutoff was performed at 10,000/ μ l, 86% at 26,000/ μ l, and 80% at 30,000/ μ l. Concerning PPV, the results were 100%, 50%, and 40% for cutoffs performed at 10,000, 26,000, and 30,000/ μ l, respectively.

Conclusion: The method is easily carried out at any place where an electronic cell counter is available, and, apparently, with good sensibility, specificity, PPV, and specially NPV.

APÊNDICE

Protocolo
Quantificação de Corpúsculos Lamelares
no Líquido Amniótico

IDENTIFICAÇÃO MATERNA

Nome: _____ Registro: _____ Data do Parto: / /

Idade: _____ Raça: _____

ANTECEDENTES MATERNOS

Patologias prévias: SIM () NÃO ()

Qual(is) _____

Gesta__ Para__ Aborto__

GESTAÇÃO ATUAL

DUM: / /

Idade gestacional: (DUM) _____

(USG __ sem) _____

Fez acompanhamento pré-natal ?

SIM () NÃO ()

Intercorrências Obstétricas:

SIM () NÃO () Qual(is) _____

Uso de medicação:

SIM () NÃO () Qual(is) _____

Fez uso de corticoesteróide antes da interrupção da gestação?

SIM () NÃO ()

Foram realizados outros testes para verificar Maturidade Pulmonar Fetal?

SIM () NÃO ()

INFORMAÇÕES SOBRE O RN

Sexo: Masc () Fem ()

Capurro Somático: _____

Apgar: 1' ____ 5' ____

CARACTERÍSTICA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

Contaminação com: SANGUE () MECÔNIO () NENHUMA ()

RESULTADO

Primeira verificação: _____

Segunda verificação: _____

Média: _____

(Teste de Obertura
VPP e VPP e sensibilidade)

Lamellar body concentrations and the prediction of fetal pulmonary maturity

George Fakhoury, MD, Norman H. Daikoku, MD, Jean Benser, MT, and Norman H. Dubin, PhD

Baltimore, Maryland

OBJECTIVE: Amniotic fluid lamellar body concentration was quantified in pregnancy and compared with the lecithin/sphingomyelin ratio and phosphatidylglyceryl to predict fetal lung maturity.

STUDY DESIGN: Amniotic fluid was obtained from 56 patients at various gestational ages (16 to 42 weeks) and quantified on a Coulter counter set for particle size used for platelets (2 to 20 fl). The lamellar body concentration best agreeing with a mature lecithin/sphingomyelin ratio of 2 and with phosphatidylglycerol was determined. The lamellar body concentration cutoff was compared with the lecithin/sphingomyelin ratio and phosphatidylglycerol as a predictor of fetal lung maturity.

RESULTS: Lamellar body concentration increased exponentially with gestation ($r = 0.70$, $p < 0.001$), as did the lecithin/sphingomyelin ratio ($r = 0.78$, $p < 0.001$). The two tests correlated with each other linearly ($r = 0.67$, $p < 0.001$). The lamellar body concentration cutoff value that best agreed with both mature lecithin/sphingomyelin ratio and phosphatidylglycerol was 30,000/ μ l (κ -test 0.66 and 0.73, respectively). In 28 patients delivered within 72 hours the lamellar body concentration correctly predicted four cases of respiratory distress syndrome (100% sensitivity and specificity).

CONCLUSION: This study confirms that lamellar body concentration is a reliable and practical assay and should be evaluated further, especially for use in a community hospital setting. (*AM J OBSTET GYNECOL* 1994;170:72-6.)

Key words: Amniotic fluid fetal pulmonary maturity testing, lamellar body concentration, automated lamellar body counting by Coulter counter

A major concern among obstetricians is iatrogenic respiratory distress syndrome (RDS) caused by surfactant deficiency of prematurity. Among the available tests the most widely accepted standard remains the lecithin/sphingomyelin (L/S) ratio and phosphatidylglyceryl using thin-layer chromatography.¹⁻³ The sensitivity and specificity of the L/S ratio is 83% and 98%, respectively, indicating that this test is an excellent predictor of pulmonary maturity.² The complexity and the need for special equipment limit the application of these tests to larger, more sophisticated laboratories.¹

Surfactant containing lamellar bodies is secreted by type II pneumocytes. Thus lamellar body counts are a potential direct assay to determine fetal pulmonary maturity. They are easy to quantify and require no special instrumentation. Lamellar body counts >30,000 particles/ μ l have been associated with fetal pulmonary maturity, according to previous reports.⁵ The method used for quantification is easily performed

in any hospital that has a clinical laboratory and Coulter counter 660 (Coulter, Hialeah, Fla.) or any automated particle counter for automated platelet quantitation.

The purpose of our study is to quantify amniotic fluid lamellar body counts during the second and third trimester of pregnancy, compare lamellar body concentration with the L/S ratio and phosphatidylglycerol, and to assess the ability of lamellar body concentration to predict RDS compared with the L/S ratio and the phosphatidylglycerol assay.

Material and methods

Amniotic fluid samples were obtained from 56 patients for genetic studies, mid-trimester saline abortions, or documentation of fetal lung maturity. These samples were used to construct a lamellar body concentration profile between 16 and 42 weeks' gestation. Samples were obtained in all cases for obstetric reasons, and only excess material was used for assays. Bloody fluid and meconium-stained fluid were discarded from this study protocol. This investigational protocol was approved by the Union Memorial Hospital Human Research Committee.

Forty-eight amniotic fluid specimens were available for comparison of the L/S ratio, phosphatidylglycerol, and lamellar body count. Twenty-eight specimens were

From the Departments of Gynecology and Obstetrics and Laboratory Medicine, Union Memorial Hospital.

Received for publication January 22, 1993; revised June 21, 1993; accepted July 19, 1993.

Reprints not available.

*Copyright © 1994 by Mosby-Year Book, Inc.
0002-9378/94 \$1.00 + .20 6/1/50148*

obtained within 72 hours of delivery. Phosphatidyl profiles for L/S ratio and phosphatidylglycerol were performed by the Helena Fetal TEK 200 method (Helena, Beaumont, Tex.). Lamellar body counts were quantitated with a Coulter counter 660 (Coulter). The equipment was set for the size parameters used for platelet counts between 2 and 20 fl in volume. The samples were analyzed immediately after collection or stored at 4° C until processed within 3 days. Samples were mixed by gentle inversion, poured into a disposable 12 × 75 mm test tube, and centrifuged for 3 minutes at 500g to remove cellular debris. The supernatant was then tested with a Coulter counter 660. The Coulter analytical method quantitated lamellar body concentration by measuring changes in electrical resistance produced by a particle, suspended in a conductive liquid, traversing a small aperture.⁶ When cells are suspended in a conductive liquid (diluent), they function as discrete insulators. When a dilute suspension of cells is drawn through a small cylindrical aperture, the passage of each cell momentarily increases the resistance of the electrical path between two submerged electrodes, one located on each side of the aperture. An electrical pulse, suitable for counting and sizing, results from the passage of each cell through the aperture. Each sample was tested three times with the triplicate results within 5%. The variance of the Coulter counter was determined by using low-level platelet controls within the 30,000 particle/ μ l range and found to be 4%.

Gestational age was determined by best estimate on the basis of the last menstrual period and serial ultrasonography. Newborn Dubowitz assessment was performed to confirm gestational age.

Respiratory distress was diagnosed by accepted definitions of RDS,⁷ which include tachypnea, grunting, hypoxia, characteristic chest radiograph, need for oxygen by intubation or hood for 24 hours within the first 72 hours of life, as diagnosed by the neonatologist.

Data were analyzed by simple regression with a Statgraphics statistical package (STSC, Rockville, Md.). Probabilities of <0.05 were considered significant. A positive L/S ratio was defined as ≥ 2 , whereas the phosphatidylglycerol test was defined as a value present or absent. Agreement between lamellar body concentration versus the L/S ratio and lamellar body concentration versus phosphatidylglycerol was analyzed as follows. Positive agreement was calculated as the number of results that were positive in both tests expressed as a percentage of all LBC positive tests. Similarly, a negative agreement was determined (i.e., the number of tests in which both results were negative expressed as a percent of all LBC negative tests). Mathematically the computation is the same as determining the sensitivity and specificity of a test against a true outcome. Finally, an overall agreement was determined by summing all

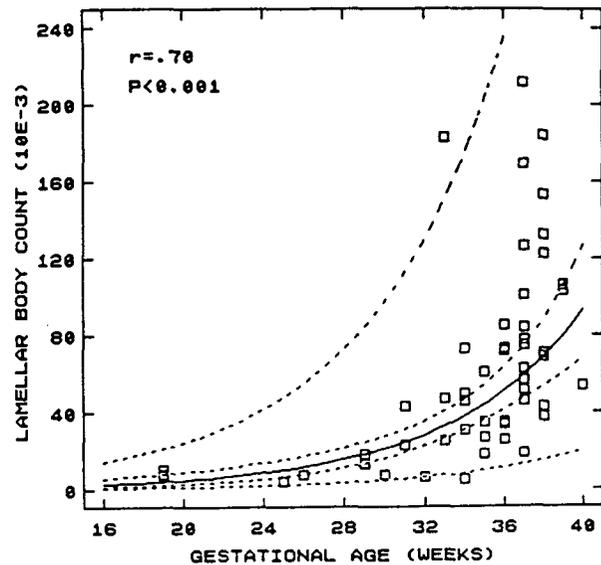


Fig. 1. Curvilinear regression analysis of lamellar body counts versus gestational age. Internal dotted lines, 95% Confidence limits; external dotted lines, prediction limits.

tests with positive and negative agreement and expressing the results as a percent of all tests, as described previously.⁸ The κ -statistic, which calculates agreement compared with that which would be expected by chance alone, was also determined. A κ -value >0.75 indicates excellent agreement beyond what would have occurred by chance, 0.4 to 0.75 indicates fair to good agreement, and <0.4 indicates poor agreement.⁸

Results

A regression analysis plotting lamellar body counts against fetal gestational age is represented in Fig. 1. Lamellar body counts is best represented as an exponential curvilinear function of gestational age. The correlation coefficient is 0.70 ($p < 0.001$). The L/S ratio similarly displays an exponential curvilinear function against gestational age with a correlation coefficient of 0.78 ($p < 0.001$) (Fig. 2). A linear regression analysis of lamellar body counts versus L/S ratio demonstrates a correlation coefficient of 0.67 ($p < 0.001$) (Fig. 3).

Fig. 4, A, illustrates the positive and negative agreement of the L/S ratio test with lamellar body concentration at various cutoff values. The best compromise between the two agreements occurs at a cutoff of approximately 20,000 particles/ μ l, as indicated by the intersection of the two agreement curves. This is reflected in Fig. 5, which demonstrates that the maximum total agreement for lamellar body concentration versus L/S ratio is at the 20,000 particle/ μ l cutoff. Likewise, Fig. 4, B, illustrates positive and negative agreement of a phosphatidylglycerol test with lamellar body concen-

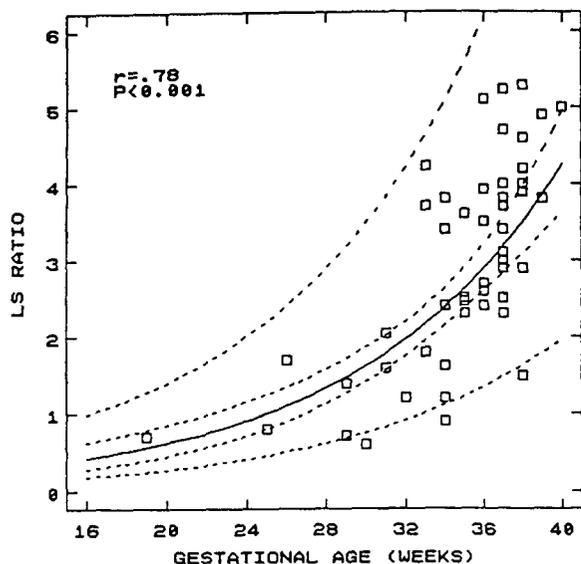


Fig. 2. Curvilinear regression analysis of L/S ratio versus gestational age.

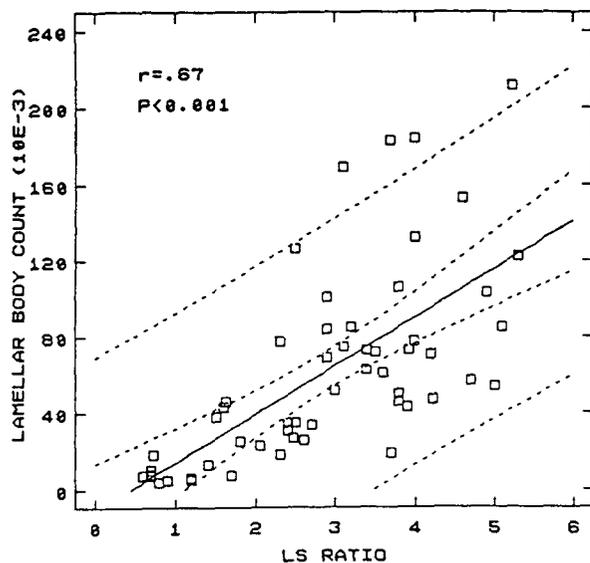
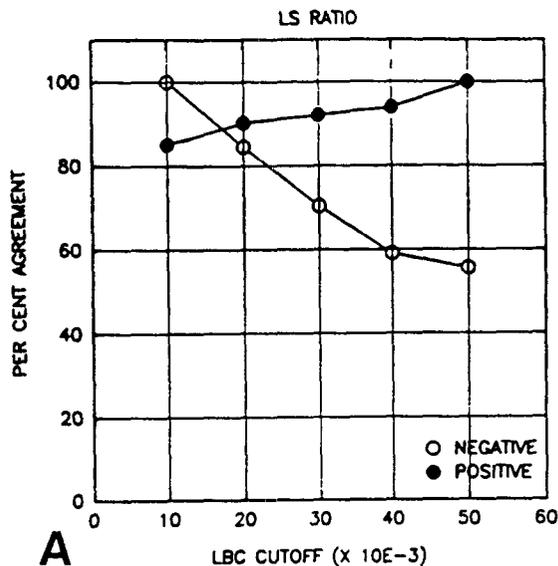
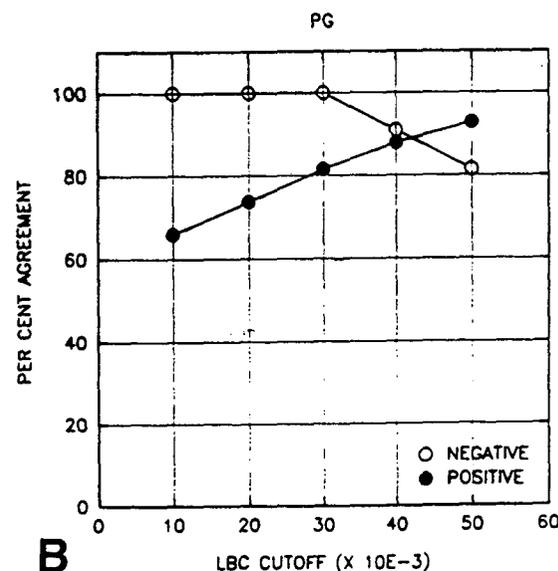


Fig. 3. Linear regression analysis of lamellar body counts versus L/S ratio.

tration at the same cutoff values. In this comparison the best compromise is at approximately the 40,000 particles/ μ l cutoff. Maximum overall agreement for lamellar body concentration versus phosphatidylglycerol occurs at the same cutoff as illustrated in Fig. 5. The best compromise in a cutoff based on the overall agreement of lamellar body concentration with both phosphatidylglycerol and L/S test is represented by the intersection of the two overall agreement curves (Fig. 5), which occurs at 28,000 particles/ μ l. On the basis of these agreement curves, we chose 30,000 as a convenient



A



B

Fig. 4. A, Positive and negative agreement of the L/S ratio with lamellar body concentration (LBC) at various cutoff values. B, Positive and negative agreement of phosphatidylglycerol (PG) with lamellar body concentration at various cutoff values.

cutoff. At this cutoff agreement with the L/S ratio was 85.5% (κ -test 0.66) and with phosphatidylglycerol was 87.3% (κ -test 0.73).

Table I presents the clinical outcome of RDS as predicted by lamellar body concentration at 30,000 particles/ μ l cutoff and L/S ratio of 2:1 and the presence of phosphatidylglycerol. There was no RDS when lamellar body concentration was >30,000 particles/ μ l but RDS occurred in four cases when lamellar body concentration was <30,000 particles/ μ l. In this small study the sensitivity of RDS prediction was 100% and specificity

Table I. Clinical outcome of RDS using lamellar bodies, phosphatidylglycerol, and L/S ratio

	RDS	No RDS	Sensitivity	Specificity
Lamellar bodies < 30,000 particles/ μ l	4	0	4/4	24/24
Lamellar bodies > 30,000 particles/ μ l	0	24		
Phosphatidylglycerol negative	4	0	4/4	24/24
Phosphatidylglycerol positive	0	24		
L/S ratio < 2	3	0	3/4	24/24
L/S ratio > 2	1	24		

was 100% for both lamellar body concentration and phosphatidylglycerol. One of four cases of RDS occurred with L/S ratio 3.7, phosphatidylglycerol negative, and lamellar body concentration of 19,000 particles/ μ l. The neonate at 33-weeks' gestation (2185 gm) had mild-to-moderate RDS and was on hood oxygen for 5 days. The mother had premature labor and premature rupture of the membranes. There was no evidence of diabetes mellitus.

Comment

Lamellar bodies have long been recognized to have a direct relationship with fetal lung maturity. Previously, technical difficulties have made lamellar bodies assays impractical for fetal lung maturity assessment.⁴ Dubin⁹ successfully used a commercial cell counter to quantitate lamellar bodies in amniotic fluid.

The Coulter counter is adjusted to measure platelet size between 2 and 20 fl, rejecting particles outside these limits. Because lamellar body size is in the range of 1 to 5 μ m (1.28 to 6.4 fl),¹⁰ with most being near 2 μ m in diameter (2.56 fl), the Coulter counter can be used to assay lamellar body counts.⁶⁻⁹ However, Dubin estimates that as much as 10% of the total mass of lamellar bodies may be uncounted below 2 fl (1.56 μ m).⁹

The lamellar body concentration and L/S ratio curves were very similar, indicating that as gestational age increases, the L/S ratio and lamellar body count increases. There is also a strong linear correlation between L/S ratio and lamellar body count. The linear regression analysis of lamellar body counts versus L/S ratio is comparable to the results of Ashwood et al.⁶

Our data showed good agreement between 30,000 particles/ μ l lamellar body concentration and phosphatidylglycerol and between lamellar body concentration and the L/S ratio. All tests had good sensitivities and specificities in predicting RDS. However, the small number of samples ($N = 28$) in our study prevent us

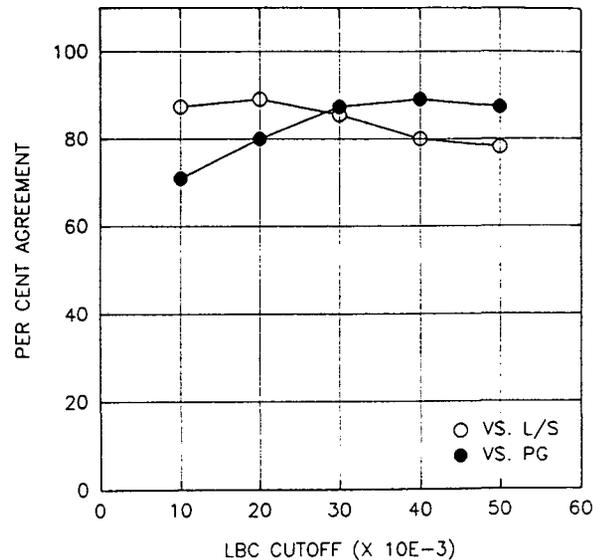


Fig. 5. Overall agreement between L/S ratio and phosphatidylglycerol (PG) with lamellar body concentration (LBC) at various cutoff values.

from determining if there is any significant differences between the tests. The lamellar body concentration is an excellent predictor for RDS and merits further testing in larger studies.

The following technical issues must be resolved for the lamellar body concentration test. Lemuel et al.⁷ have shown that the cutoff for maturity differs by using different commercial cell counters. This test must be standardized to each type of instrument and the instrument calibrated to expect reliable lamellar body concentrations. Our standard was developed with the Coulter counter 56601S measuring particles between 2 and 20 fl, calibrated to expect 3% to 5% day-to-day variations.

Dubin⁹ found a decrease in lamellar body concentrations in centrifuged compared with noncentrifuged samples. Lamellar body concentration in centrifuged samples at 500g for 5 minutes averaged 26,000 particles/ μ l, whereas uncentrifuged samples averaged 40,000 particles/ μ l. Both centrifuged and uncentrifuged samples can be used with different cutoffs. In our study samples were centrifuged for 3 minutes at 500g to remove cellular debris, as recommended for the Helena Fetal-Tek phosphatidyl profiles.

Conflicting results of the effect of blood-contaminated samples remain to be resolved. Ashwood et al.⁶ report an 8% decrease in lamellar body concentration by adding 0.1% ethylenediaminetetraacetic acid-treated whole blood to an uncontaminated amniotic fluid sample (1% whole blood contamination decreased lamellar body concentration 22%). Dubin⁹ showed no significant effect on the final lamellar body count by

adding uncentrifuged osmotically lysed human blood. Further work is needed to clarify and quantify the effect of hemoglobin contamination on the lamellar body concentration. Similarly, meconium staining can be light or thick. The initial report suggests meconium has no effect on the final lamellar body concentration.⁹

Lamellar bodies "uncoil" to release surfactant.^{10, 11} Sample stability over time and under different clinical conditions must be defined to assure appropriate processing and accurate clinical prediction of RDS.⁶

Because this assay is based on measuring a concentration, diluted (polyhydramnios) and concentrated samples (oligohydramnios) may affect the result. Internal controls such as creatinine, blood urea nitrogen, bilirubin, osmolality, or specific gravity might standardize results.

The advantage of a lamellar body count over the L/S ratio and phosphatidylglycerol is the simplicity of the measurement compared with the L/S ratio and phosphatidylglycerol, which are semiquantitative chromatographic methods. The L/S ratio and phosphatidylglycerol are measured by visual and densitometric comparison with standards. Observer bias may be eliminated with lamellar body counts. The laboratory method for the latter is much simpler, faster, and more readily accessible than are those for the L/S ratio or phosphatidylglycerol. Only 0.4 ml is required for the lamellar body concentration as opposed to 3 ml for L/S ratio and phosphatidylglycerol. There is 24-hour availability in any laboratory with a platelet counter. Furthermore, no special training for technologists is necessary. Finally, the cost is less. In our institution the cost of a platelet or lamellar body concentration is approximately \$5 compared with \$40 for L/S ratio and phosphatidylglycerol.

Lamellar body assay is a simple and rapid assay for

assessing fetal lung maturity. Instrumentation is standard and available in most hospital laboratories. Our study demonstrated good agreement with currently used L/S ratio and phosphatidylglycerol assay with comparable results to those found in the literature. This study, along with those reported previously, suggest that the lamellar body concentration is a reliable and practical assay, especially for use in community hospitals. Further evaluation for this purpose is justified.

REFERENCES

1. Gluck L, Kulovich MV, Borer RC Jr, Brenner PH, Anderson GG, Spellacy W. Diagnosis of respiratory distress syndrome by amniocentesis. *AM J OBSTET GYNECOL* 1971; 109:440-5.
2. Harvey D, Parkinson CE, Campbell S. Risk of respiratory distress syndrome. *Lancet* 1975;1:42.
3. Kulovich MV, Hallman MB, Gluck L, et al. The lung profile. I. Normal pregnancy. *AM J OBSTET GYNECOL* 1979; 135:57-63.
4. Chapman JF, Herbert WNP. Current methods for evaluating fetal lung maturity. *Lab Med* 1986;17:597-602.
5. Lemuel J, Bowie PHD, Shanmo J, Dohnal JC, Farrell E, Vye MV. Lamellar body number density and the prediction of respiratory distress. *Clin Chem* 1991;95:781-6.
6. Ashwood ER, Oldroyd RG, Palmer SE. Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 1990;75:289-92.
7. Farrell P, Avery M. Hyaline membrane disease. *Am Rev Respir Dis* 1975;111:659.
8. Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. New York: John Wiley, 1981.
9. Dubin SB. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1989;35:612-6.
10. Hook GER, Gilmore LB, Tombropoulos EG, Fabro SE. Fetal lung lamellar bodies in human amniotic fluid. *Am Rev Respir Dis* 1978;117:1541-50.
11. Lee W, Bell M, Novy MJ. Pulmonary lamellar bodies in human amniotic fluid: their relationship to fetal age and the lecithin/sphingomyelin ratio. *AM J OBSTET GYNECOL* 1980;136:60-6.

**TCC
UFSC
TO
0125**

Ex.1

N.Cham. TCC UFSC TO 0125

Autor: Volpato, Lia Karin

Título: Determinação da maturação pulmon



972803220

Ac. 254260

Ex.1 UFSC BSCCSM