

Controlo da Qualidade em Hemoglobinopatias

Armandina Miranda

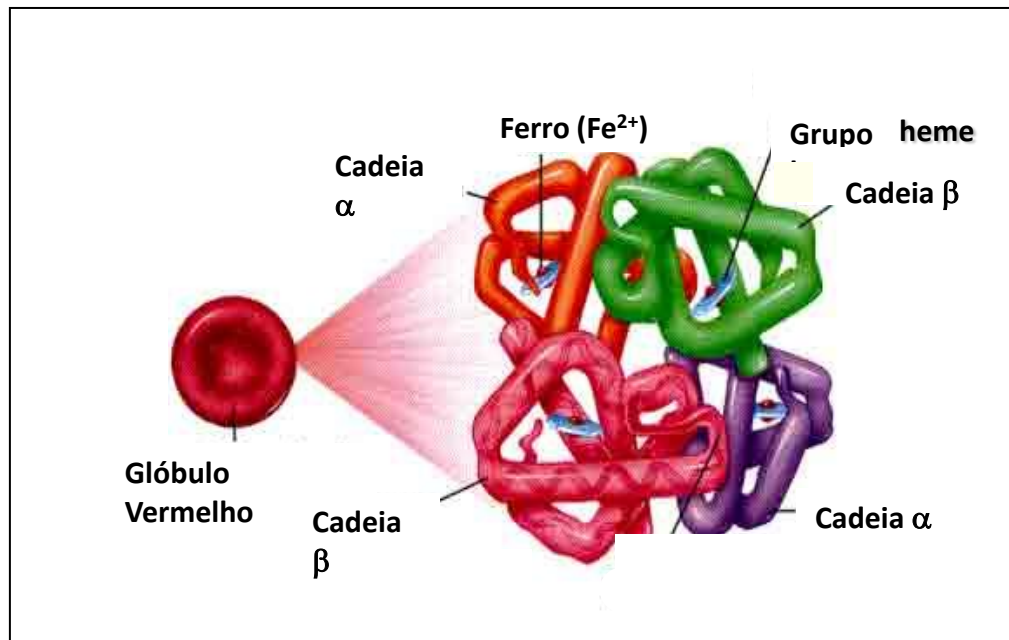
armandina.miranda@insa.min-saude.pt

Departamento de Promoção da Saúde- DPS
Grupo de Trabalho de Hematologia do PNAEQ-DEP, INSA ,Lisboa

***Apresentado no 42º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas/ 21 -
24 Junho 2015 – Rio de Janeiro***

Hemoglobina

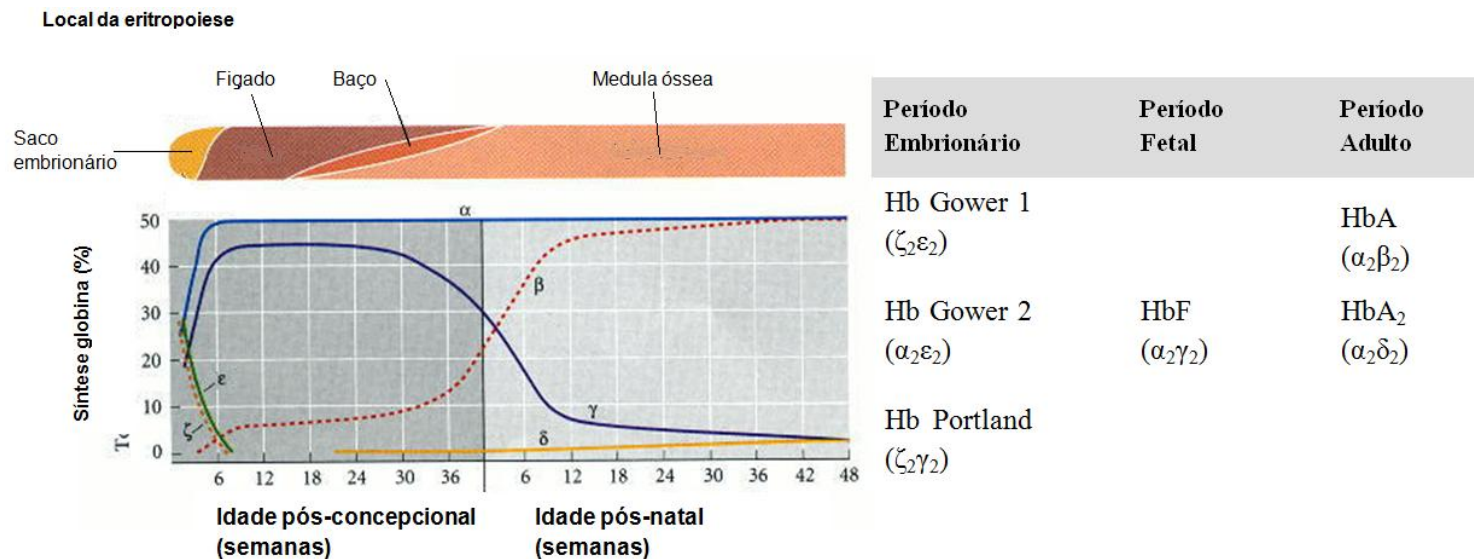
A hemoglobina é uma metaloproteína globular tetramérica



Representação da estrutura de uma molécula de hemoglobina.

- duas subunidades tipo α e duas tipo não- α
- quatro grupos heme (grupo prostético)

Hemoglobinas humanas nos diferentes períodos do desenvolvimento

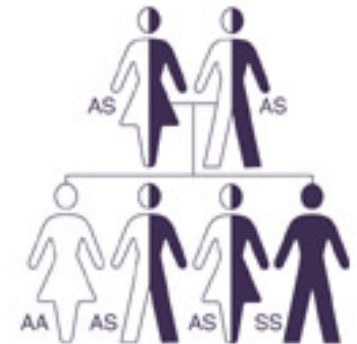


Hemoglobinas humanas na vida adulta

Hemoglobina	cadeias	percentagem
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	96 a 98 % da Hb total
Hb A ₂	$\alpha_2\delta_2$	2 a 3,0 % da Hb total
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	< 1 % da Hb total

Hemoglobinopatias

doenças monogénicas hereditárias de transmissão autossómica recessiva resultantes de mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina da hemoglobina, ou as suas regiões regulatórias



Podem ser classificadas em dois grupos principais:

✓ Talassemias

Resultam da diminuição ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias de globina. Ex β - talassemia, α - talassémia

✓ Variantes estruturais

Hemoglobinas de estrutura anómala- 95% devidas à substituição de um aminoácido, Ex Hb S, Hb C, Hb D, Hb E, Hb Lepore

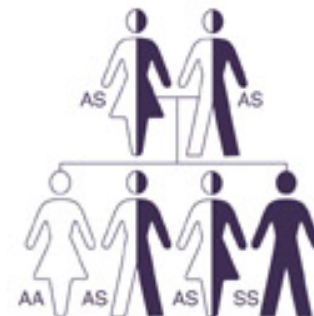
A forma mais eficaz de controlo desta patologia é a prevenção:

- ☐ **Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias**
- ☐ **Aconselhamento genético de casais em risco**
- ☐ **Oferta de diagnóstico pré-natal**
- ☐ **Estabelecimento de centros de referência de acordo com as recomendações**
- ☐ **Investigação em hemoglobinopatias**
- ☐ **Realização de registos**
- ☐ **Formação do pessoal de saúde e do público em geral**

A forma mais eficaz de controlo desta patologia é a prevenção:

- ☐ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias e de casais em risco

rastreios e confirmações em colaboração com laboratórios de saúde pública, e outras entidades de saúde, públicas e privadas



- ☐ Aconselhamento genético de casais em risco
- ☐ Oferta de diagnóstico pré-natal
- ☐ Realização de registos
- ☐ Investigação em hemoglobinopatias

- ☐ Estabelecimento de centros de referência de acordo com as recomendações

laboratório diferenciado na área das hemoglobinopatias, que dispõe de tecnologias com maior sensibilidade e especificidade. Colaboração com laboratório de diagnóstico molecular e com o laboratório de investigação.



- ☐ Formação do pessoal de saúde e do público em geral

estágios, atividades letivas, seminários, elaboração de folhetos de divulgação, colaboração com o PNAEQ



Antenatal screening: combinations that give rise to the risk of a foetus affected by a severe haemoglobinopathy

(adapted from the work of Prof. B. Modell and published by the UK National Screening Committee)

		Mother										
Father	Carrier of:	Hb S	β -thalassaemia	$\delta\beta$ -thalassaemia	Hb Lepore	Hb E	Hb O _{Ara}	Hb C	Hb D _{Punjab}	HPFH*	α^0 -thalassaemia	α^{+} -thalassaemia
	Hb S											
	β -thalassaemia											
	$\delta\beta$ -thalassaemia											
	Hb Lepore											
	Hb E											
	Hb O _{Ara}											
	Hb C											
	Hb D _{Punjab}											
	HPFH*											
	α^0 -thalassaemia											
	α^{+} -thalassaemia											



Serious risk: to offer counselling and antenatal diagnosis



Less serious risk: to offer counselling and further investigation maybe required



No risk

Análises Laboratoriais:

➤ Fase pré-analítica

análise requisição
colheita amostra
transporte da amostra
conservação da amostra

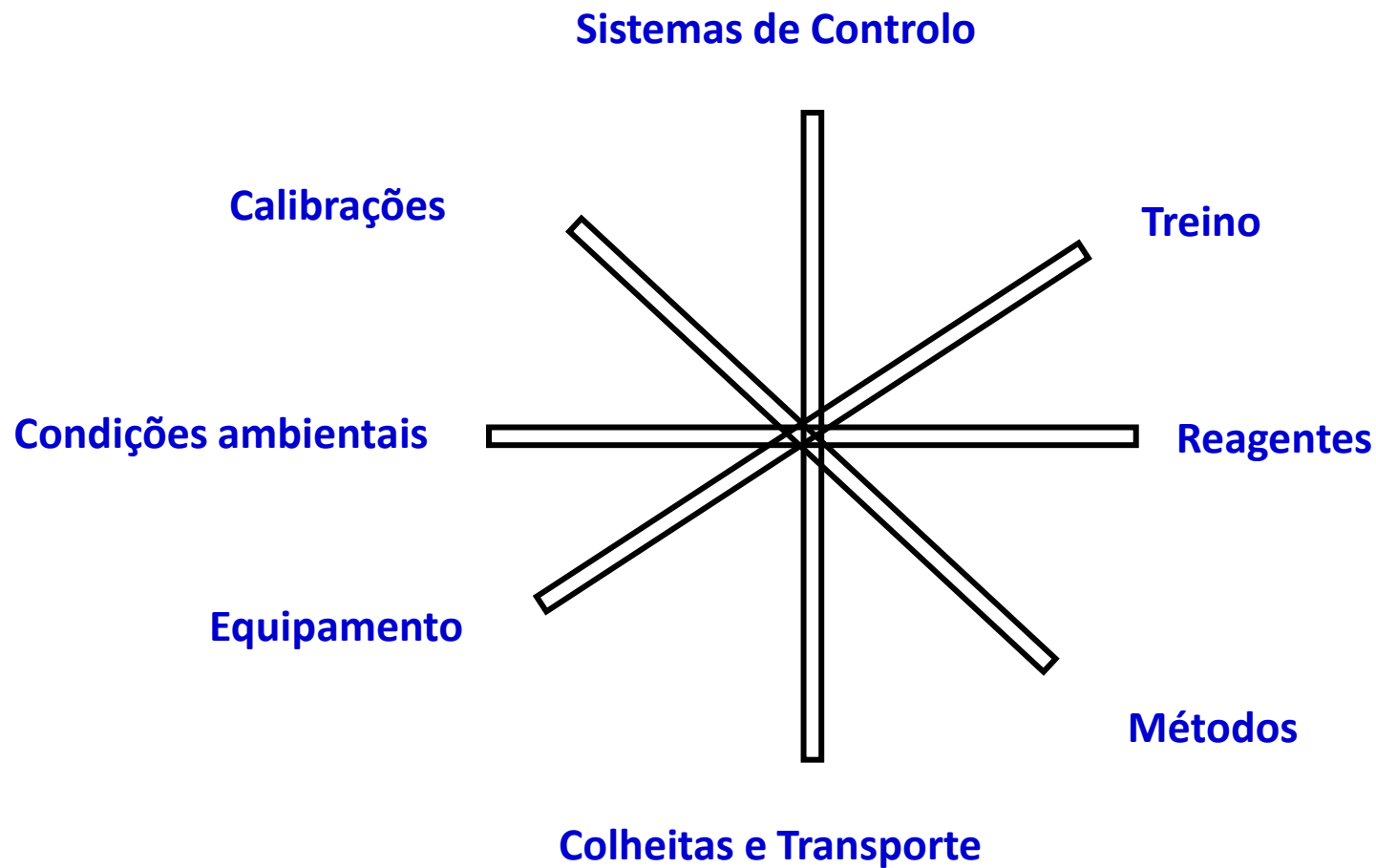
➤ Fase analítica

processamento e exame de
amostras biológicas

➤ Fase pós-analítica

validação
interpretação
emissão relatório

Fatores que influenciam os resultados Laboratoriais:



Os resultados do processo analítico estão sujeitos a erros:

■ Erros grosseiros

Não têm qualquer justificação científica: resultam de falta de atenção e organização

Ex: trocas de amostra, leituras incorrectas, transcrições incorrectas

■ Erros fortuitos

Resultam de imprecisões em medições. Ex: leituras fotométricas, pipetagens, pesagens.

Afetam a reprodutibilidade dos resultados e podem ser avaliados através da repetição de medições sobre o mesmo objeto.

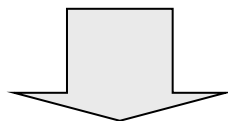
■ Erros sistemáticos

Resultam de uma causa física ou química. Ex: deterioração de um padrão.

São responsáveis pela deslocação de resultados todos no mesmo sentido, altos ou baixos.

Os **erros sistemáticos e fortuitos**, somados em sucessão, ao longo do processo analítico, são causa de dispersão e **variabilidade dos resultados laboratoriais**

Esta **variabilidade** que, em certa medida não se pode evitar, tem que se conhecer numericamente, para a podermos manter entre limites constantes e de aceitabilidade



Controlo da Qualidade:

Processo estatístico para monitorizar e avaliar um procedimento analítico que produz resultados.

Ensaio regular dos produtos de C.Q. em paralelo com as amostras a analisar.

Comparação dos resultados do C.Q. com limites estatísticos específicos (intervalos de valores).

Estatística do Controlo de Qualidade

Média (\bar{X}) - somar todos os valores obtidos com o controlo e dividir pelo número total de valores.

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

n = nº de determinações

Desvio padrão (D.P.) - é um valor estatístico que quantifica a forma como um valor numérico está em relação com os outros.

$$D.P. = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Coefficiente de Variação (C.V.) - corresponde ao desvio padrão relativo à média, em percentagem.

$$C.V.(\%) = \frac{D.P. \times 100}{\bar{X}}$$

Mediana - é o valor que ocupa a posição central de um conjunto de valores ordenados se o (nº ímpar) ou a média dos dois valores centrais (nº par).

Nº ímpar de valores - posição

$$\frac{n + 1}{2}$$

Nº par de valores - média entre

$$\frac{n}{2} \text{ e } \frac{n}{2} + 1$$

Precisão e Exatidão

A precisão corresponde à reprodutibilidade dos resultados.

A precisão quantifica-se através dos índices estatísticos:

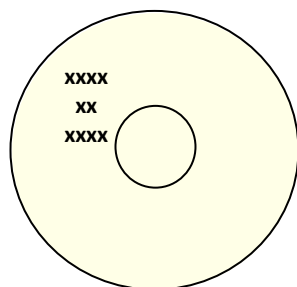
- **Desvio padrão**
- **Coeficiente de Variação**

A inexatidão corresponde ao desvio entre um valor obtido ou a média de muitos valores em repetição e o valor verdadeiro ou esperado

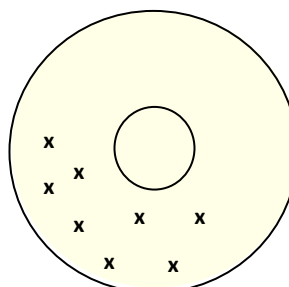
A inexatidão ou *Bias* quantifica-se em percentagem pela fórmula:

$$Bias\% = \frac{x - Alvo}{Alvo} \times 100$$

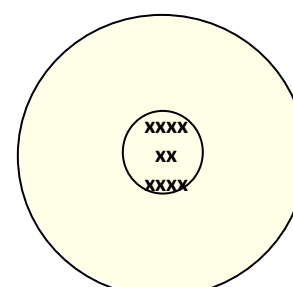
Precisão e Exatidão



Preciso
Não exato

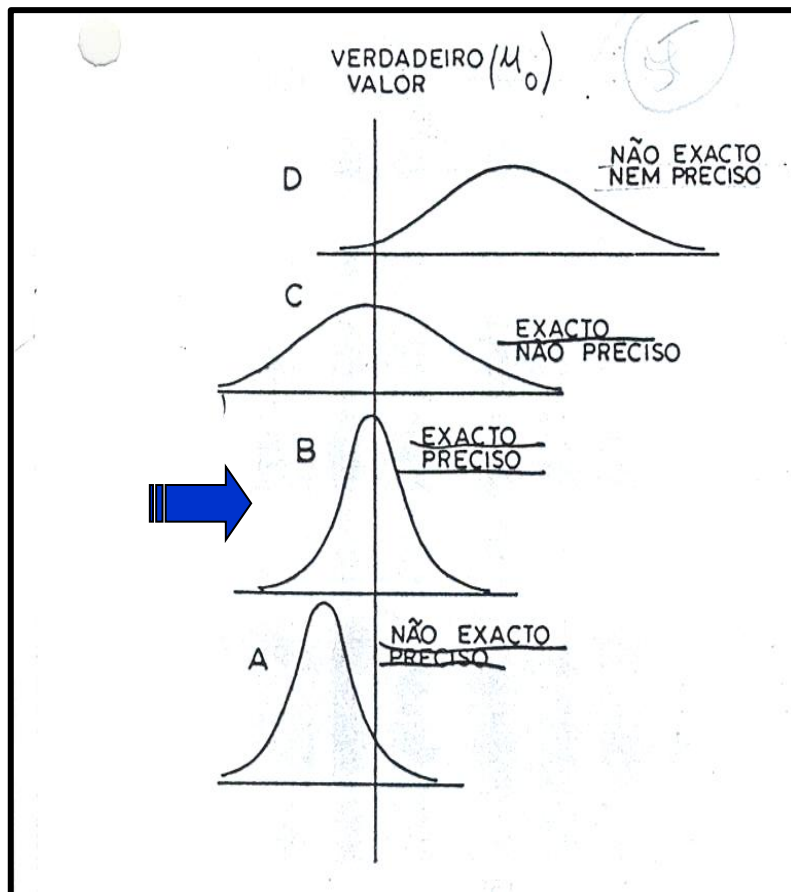


Não Preciso
Não exato



Preciso
Exato

Representação gráfica de **precisão** e **exatidão**



A e B representam distribuições com pequeno desvio padrão ou grande precisão.

C e D representam distribuições com grande desvio padrão ou baixa precisão.

B e C representam distribuições com resultados exatos.

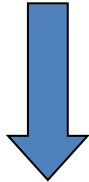
A e D representam distribuições com resultados não exatos.



Exatidão e **Precisão** não estão necessariamente relacionadas

Precisão e Exatidão

Erros Exatidão



Erros Sistemáticos:

- alterações conc. padrões
- alterações reagentes ou equipamentos
- alterações do controlo

Erros Precisão



Erros Fortuitos:

- imprecisões nas pipetagens
- imprecisões nas leituras fotométricas
- imprecisões nas pesagens

Controlo de Qualidade Laboratorial

Processo estatístico para monitorizar e avaliar um procedimento analítico que produz resultados

➤ Controlo de Qualidade Interno (CQI)

➤ Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)



✓ permite avaliar e melhorar os níveis de **precisão e exatidão analítica**,

✓ **harmonização e comparabilidade** de resultados entre laboratórios



possibilitando a longo termo, uma avaliação retrospectiva do desempenho do laboratório, demonstrando a sua competência relativamente aos seus pares

Avaliação externa da Qualidade

Objetivos principais:

- Harmonização e comparabilidade de resultados entre Laboratórios.
- Avaliação da Exatidão dos resultados e reconhecimento de erros sistemáticos.
- Educacional.

Métodos Estatísticos de Avaliação de Resultados

Testes Quantitativos

Avaliação da exatidão:

Índice de desvio:

Traduz o desvio individual da média ou mediana em relação ao desvio padrão após eliminação de valores aberrantes.

$$ID = \frac{x - Alvo}{S_{alvo}} \times 100$$

CQI Precisão - Quantificação da Hb A2-Normal -2014

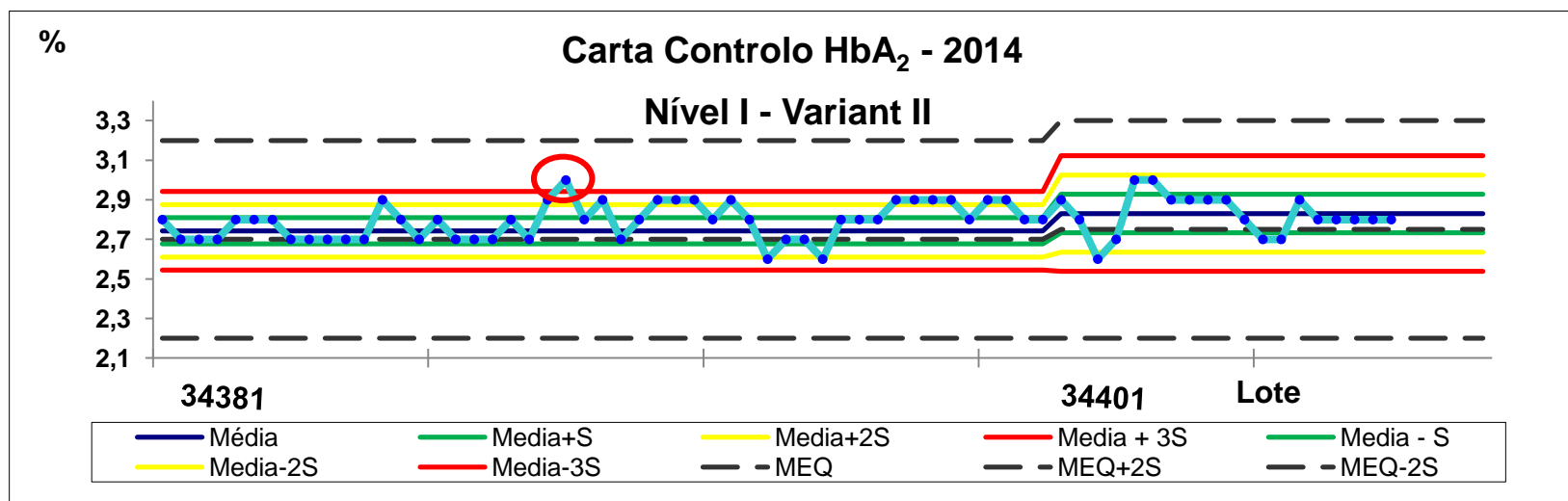
Carta de controlo

São utilizadas para representar graficamente os resultados do controlo de qualidade obtidos dia a dia ou corrida a corrida

1º - Calcular a média dos resultados

2º - Calcular o desvio padrão

3º - Calcular os limites do controlo da qualidade

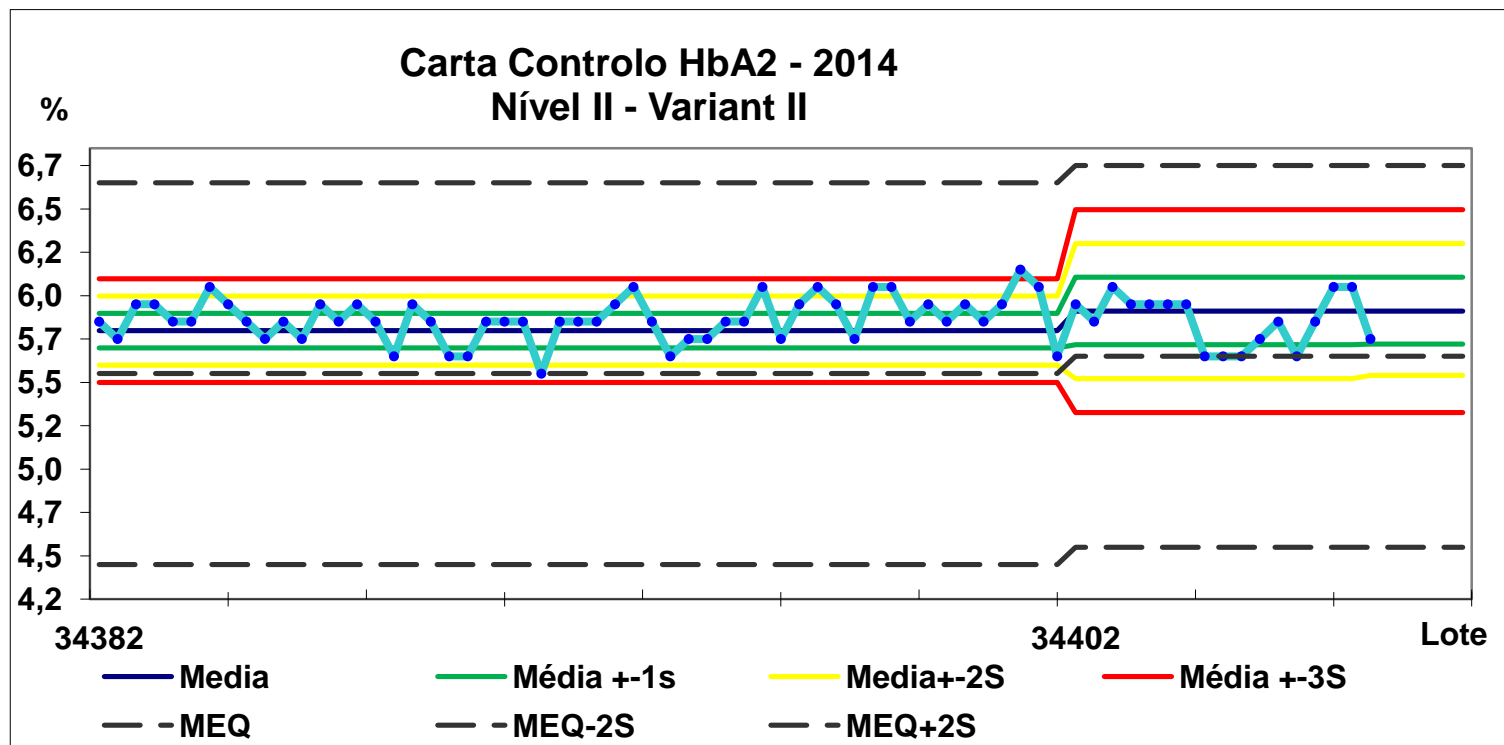


Lote -2014	34381	34401
SD	0,09	0,10
CV %	3,3	3,7
Média CV%	3,5	

Rejeição de corrida:

1_{3DP} – Regra violada quando qualquer resultado de CQ estiver fora de 3DP.

CQI Precisão - Quantificação da Hb A2-Elevada -2014

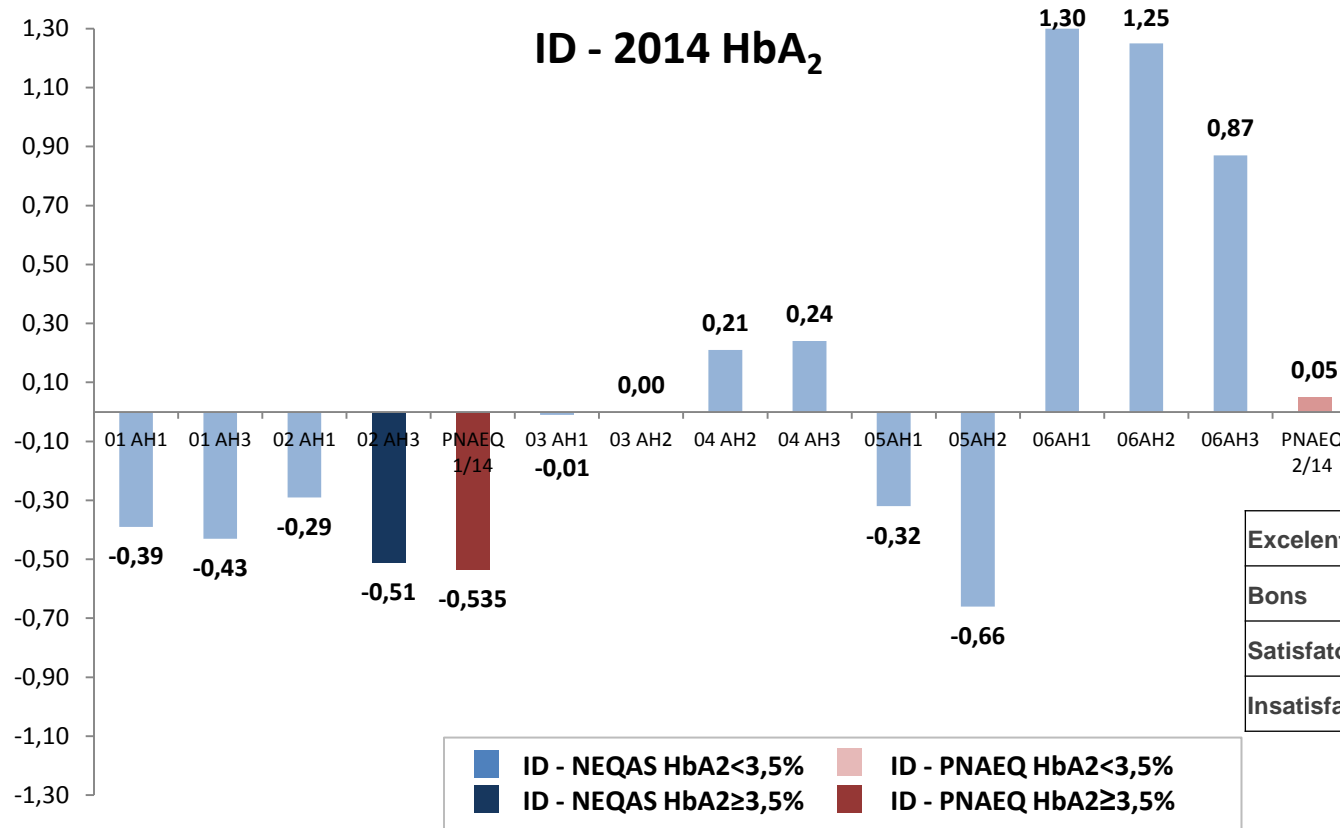


- ✓ Os limites do controlo calculados são inferiores aos do fabricante.
- ✓ O laboratório deve criar a sua própria carta de controlo.

Lote /2014	34382	34402
SD	0,13	0,15
CV	2,3	2,5
	2,4	

✓ O CV diminuiu relativamente ao nível de concentração normal (mais baixo)

AEQ Quantificação da Hb A2 - 2014



$$ID = \frac{x - Alvo}{S_{alvo}} \times 100$$

X= resultado do laboratório

Excelentes	0	<	ID	≤	0,5
Bons	0,5	<	ID	≤	2
Satisfatórios	2	<	ID	≤	3
Insatisfatórios			ID	≥	3

Variant II			HA 8160		
Bias	CV	ET	Bias	CV	ET
-0,3	3,0	5,2	4,3	2,6	8,6

$$Bias\% = \frac{x - Alvo}{Alvo} \times 100$$

$$ET = |Bias| + Z \times CV$$

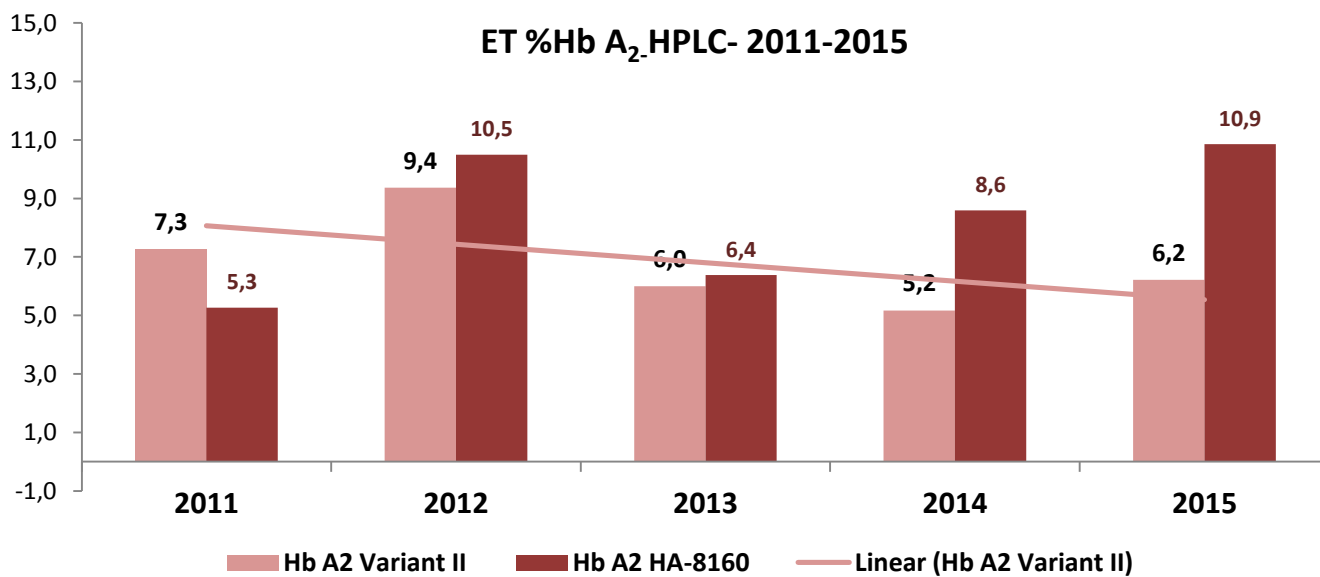
Z=1,65

Metas analíticas para o ET -quantificação da Hb A₂

Metodologia	ET% Hb A2
Variabilidade biológica	4,5
Opinião de peritos	> 9,0 (14,5%)
Necessidade clínica	7,0

Andrea Mosca, Renata Paleari and Barbara Wild: Analytical goals for the determination of HbA₂. Clin Chem Lab Med 2013; 51(5): 937-41.

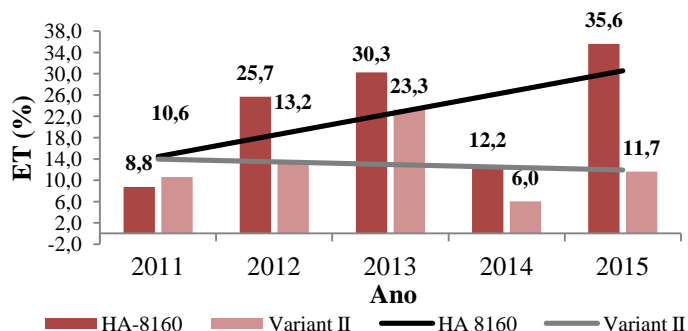
Ano	Erro Total analítico					
	Hb A ₂ <3,5%		Hb A ₂ ≥ 3,5%		Hb A ₂	
	Variant II	HA-8160	Variant II	HA-8160	Variant II	HA-8160
2011	7,2	6,4	6,9	8,4	7,3	5,3
2012	10,9	11,4	5,4	7,8	9,4	10,5
2013	8,1	6,1	6,5	12,0	6,0	6,4
2014	6,0	9,9	6,4	5,0	5,2	8,6
2015	5,8	12,1	8,7	8,7	6,2	10,9



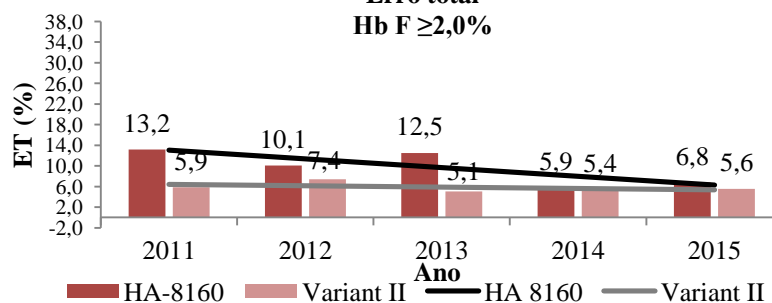
Erro total analítico- Hb F-2011-2015

Ano	Hb F < 2,0%						Hb F ≥ 2,0%						Média anual					
	Variant II			HA-8160			Variant II			HA-8160			Variant II			HA-8160		
	Bias	CV (%)	ET	Bias	CV (%)	ET	Bias	CV (%)	ET	Bias	CV (%)	ET	Bias	CV	ET	Bias	CV	ET
2011	3,2	4,5	10,6	3,8	3,0	8,8	1,6	2,6	5,9	5,4	4,7	13,2	2,1	3,6	8,0	1,6	3,9	8,0
2012	6,8	3,9	13,2	21,1	2,8	25,7	2,8	2,8	7,4	7,8	1,4	10,1	2,1	3,4	7,6	15,4	2,1	18,9
2013	17,0	3,8	23,3	25,8	2,7	30,3	0,6	2,7	5,1	9,2	2,0	12,5	14,6	3,3	20,0	23,5	2,4	27,4
2014	0,9	3,1	6,0	6,8	3,3	12,2	2,1	2,0	5,4	3,4	1,5	5,9	1,2	2,6	5,4	4,2	2,4	8,2
2015	3,1	5,2	11,7	27,3	5,0	35,6	1,8	2,3	5,6	0,7	3,7	6,8	1,7	3,8	7,8	19,6	4,4	26,8

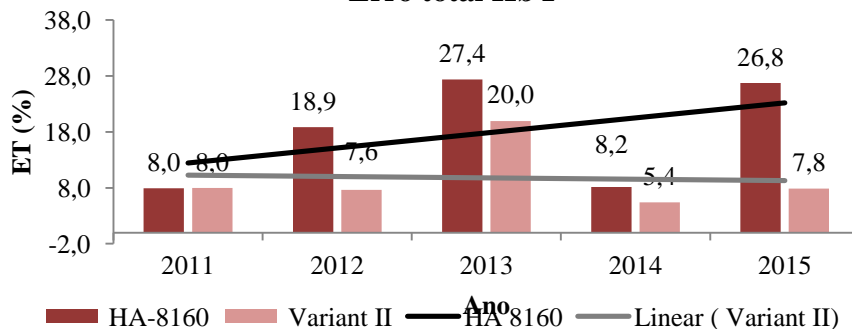
Erro total
Hb F < 2,0%



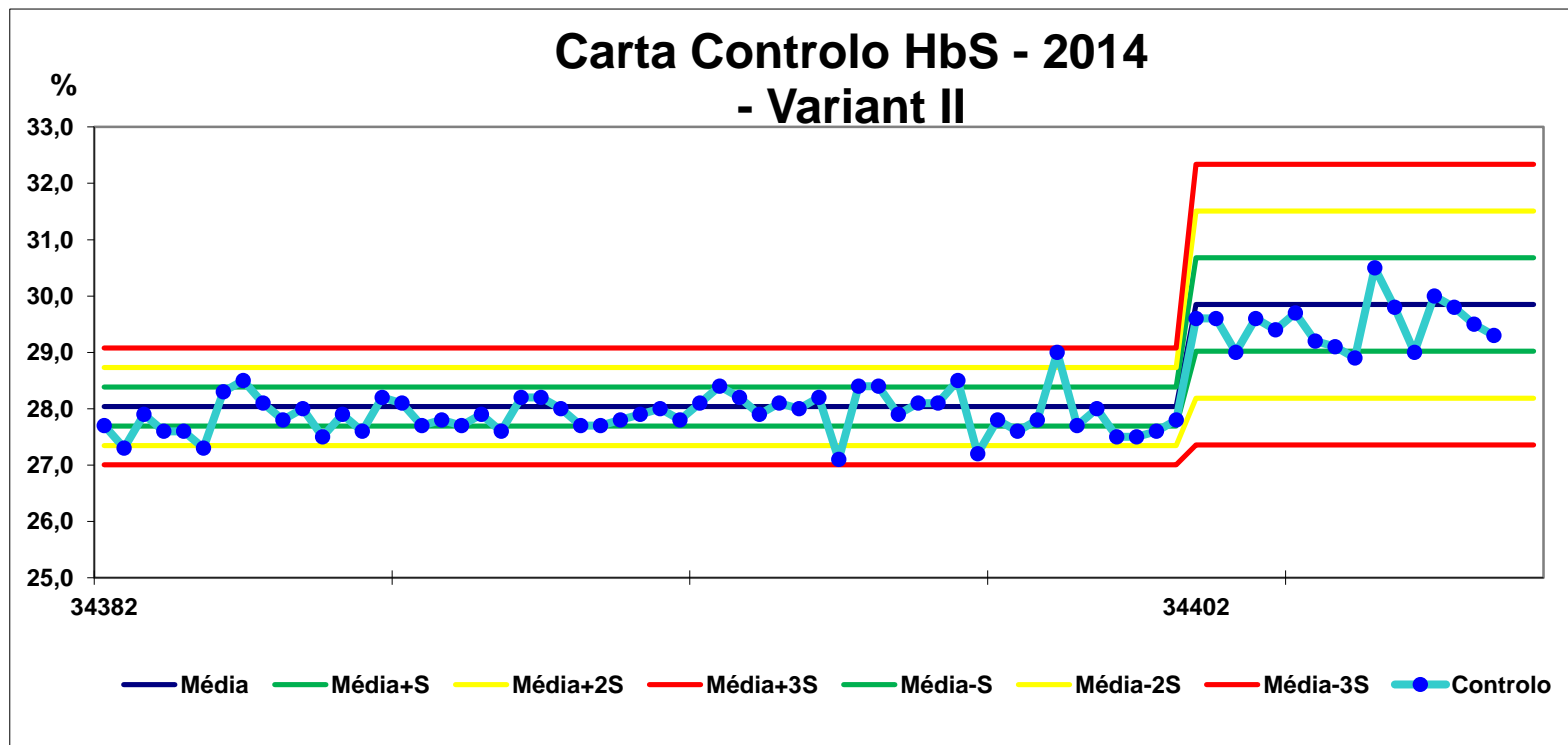
Erro total
Hb F ≥ 2,0%



Erro total Hb F



CQI-Precisão Quantificação da Hb S- 2014



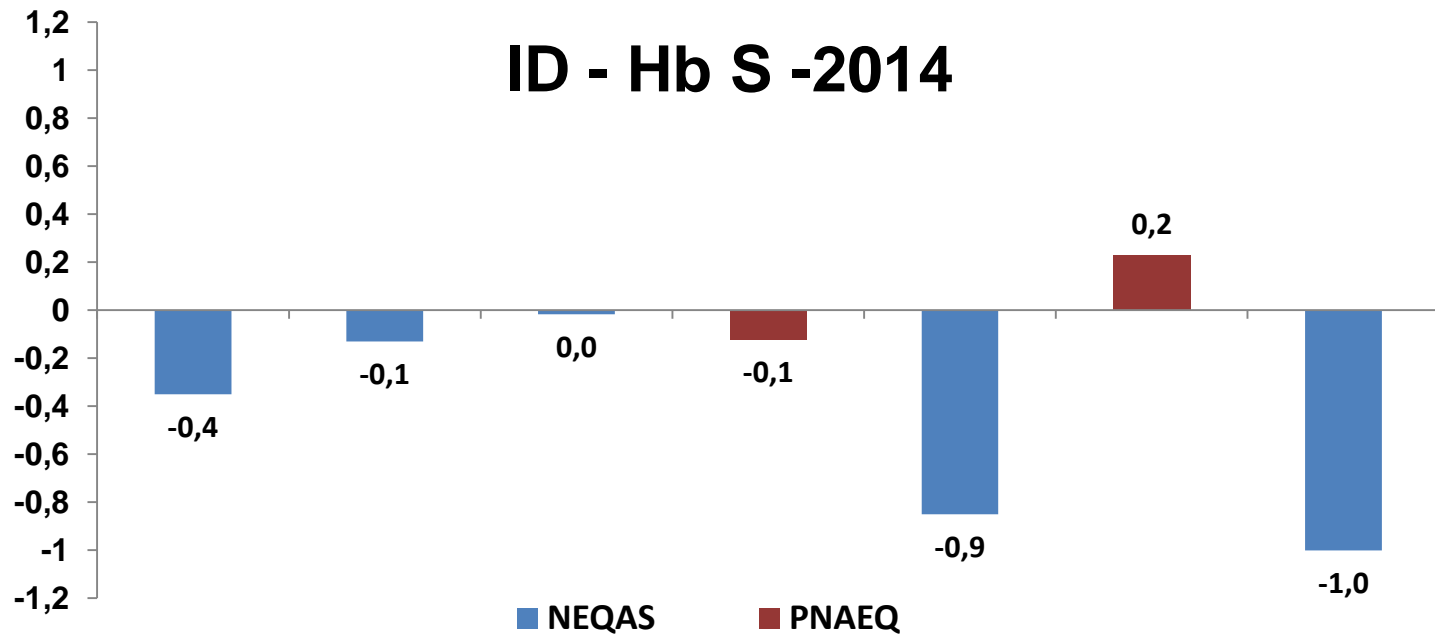
Lote /2014	34382	34402
media	27,9	29,5
SD	0,35	0,42
CV%	1,3	1,4
	1,3	

Excelentes	0	<	ID	≤	0,5
Bons	0,5	<	ID	≤	2
Satisfatórios	2	<	ID	≤	3
Insatisfatórios			ID	≥	3

$$ID = \frac{x - Alvo}{S alvo} \times 100$$

X= resultado do laboratório

AEQ Quantificação da Hb S- 2014



Variant II			HA 8160		
<i>Bias%</i>	<i>CV%</i>	<i>ET%</i>	<i>Bias%</i>	<i>CV%</i>	<i>ET%</i>
2,1	1,3	4,2	4,0	1,8	7,0

Excelentes	0	<	ID	≤	0,5
Bons	0,5	<	ID	≤	2
Satisfatórios	2	<	ID	≤	3
Insatisfatórios			ID	≥	3

Experiência PNAEQ: AEQ no âmbito das Hemoglobinopatias

✓ Quantitativos

Avaliação de equipamentos/metodologias:

Hb A2 , Hb F, Hb S

Comparação com laboratórios peritos, CV%, % de corretos (ID)

✓ Qualitativos

Identificação da fração

Comparação com laboratórios peritos e identificação de correto

✓ Casos de estudo

Critérios de seleção: interesse clínico e disponibilidade de resultados

Análise das respostas e comentários dos laboratório peritos:

Qualificação na interpretação de resultados

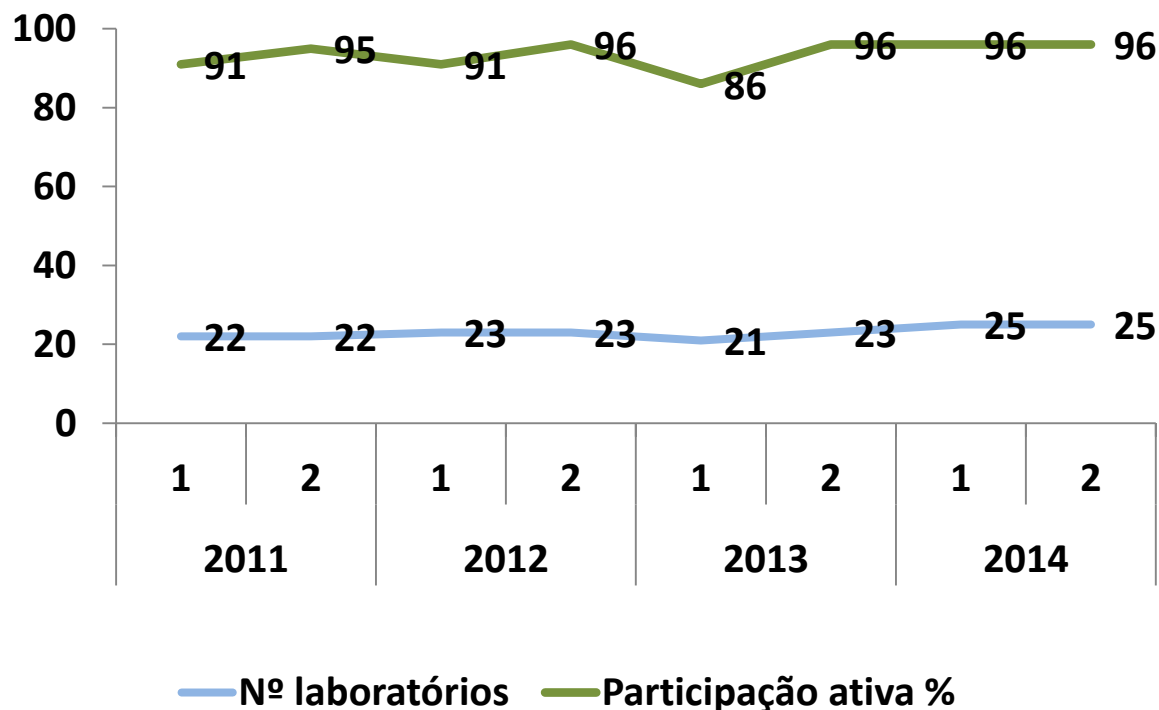
Avaliação de conhecimentos e competências

PNAEQ :Hemoglobinopatias

2011-2014

8 ensaios: 2 amostras por ensaio (amostras liofilizadas ou amostras de sangue total em EDTA) e 1 caso estudo.

Participação ativa e Nº laboratórios participantes



Avaliação de equipamentos/metodologias: Hb A₂ , Hb F, Hb S

2011-2014: 8 amostras

Hb A₂ Normal

	Todos os métodos					HLPC						Eletroforese capilar			Cromatografia microcoluna		Eletroforese /densitometria		
	Diferentes modelos / fabricantes																		
	N	Média	Mínimo	Máximo	CV %	N	Alvo peritos	Média	Mínimo	Máximo	CV %	N	Média	CV%	N	Média	N	Média	CV%
2011-amostra liof	22	2,7	1,7	3,2	9,6	15	-	2,7	2,4	2,9	6,5	1	3,1		1	2,3	2	2,1	
2012-amostra liof	24	3,2	2,5	4,0	14,2	16	3,0	3,2	2,6	3,9	12,0	1	2,7		1	4,0	3	2,8	12,7
2013- sangue EDTA	21	2,6	2,1	4,5	10,5	15	2,6	2,6	2,1	4,5	11,6	2	2,6				2	3,6	
2013-amostra liof	21	3,1	2,3	4,0	16,1	15	2,9	3,2	2,3	3,9	14,5	3	2,6	1,8	1	2,3	1	2,7	
2014-sangue EDTA	25	3,0	2,5	3,6	10,2	19	3,0	3,1	2,7	3,6	8,8	2	2,6	-	-	-	3	2,3	

Hb A₂ Elevada

	Todos os métodos					HLPC						Eletroforese capilar	Cromatografia microcoluna	Eletroforese/ densitometria				
						Diferentes equipamentos e metodologias												
	N	Média	Mínimo	Máximo	CV%	N	Alvo peritos	Média	Mínimo	Máximo	CV %	N	Média	CV%	N	Média	N	Média
2011-amostra liof	23	4,7	3,9	5,2	6,3	17	-	4,7	3,9	5,2	5,7	-	-	-	1	4,5	2	4,7
2013- sangue EDTA	23	4,7	3,8	6,0	11,4	17	4,8	4,8	3,9	5,7	10,2	3	4,6	3,7	-	-	2	5,3
2014- sangue EDTA	26	5,2	4,2	6,1	9,8	21		5,2	4,2	6,1	9,1	4	5,5	-	-	-	2	5,5

- 5 ensaios com amostras Hb A2 normal
- 3 ensaios com amostras Hb A2 elevado

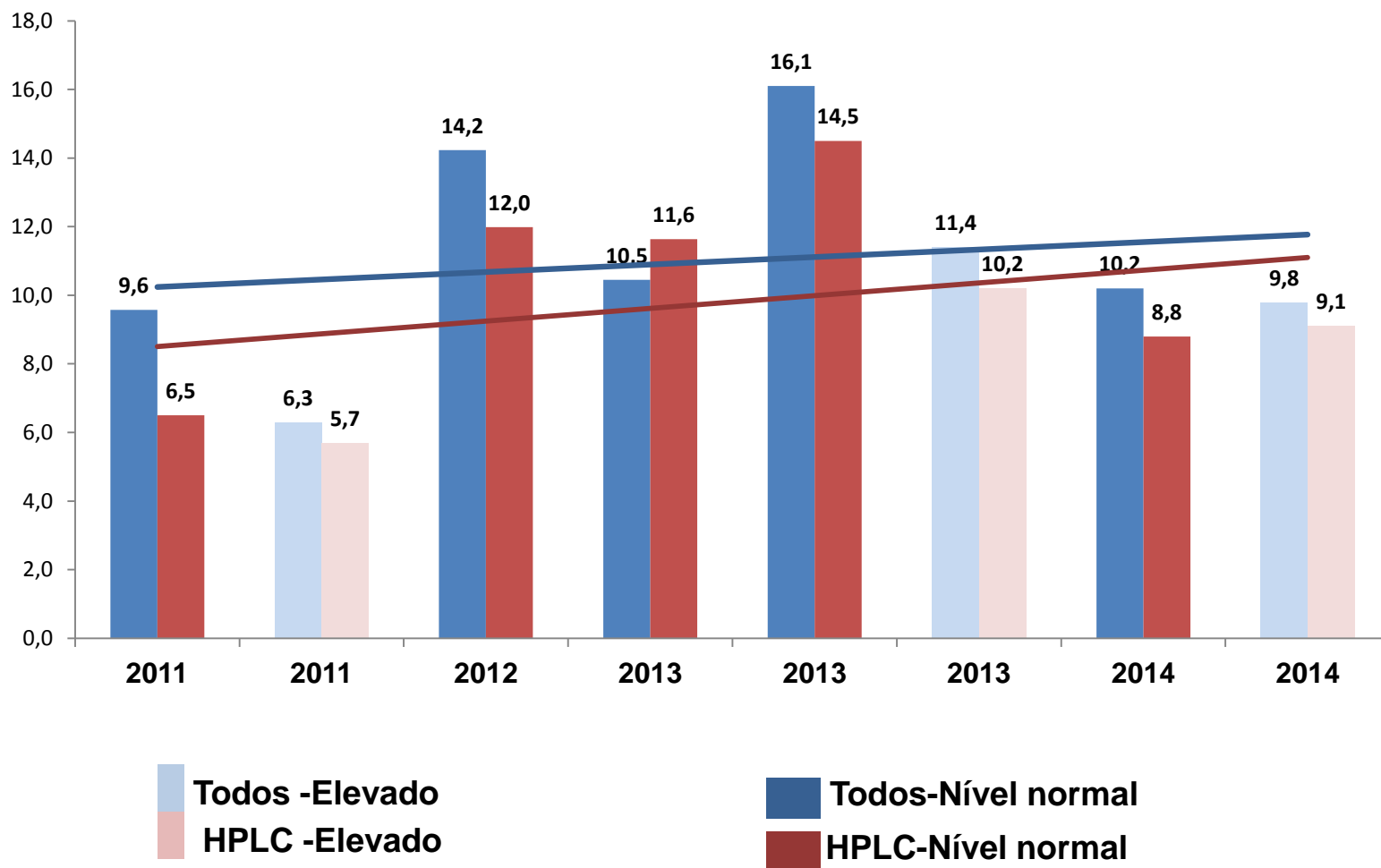
- A maioria dos laboratórios utiliza HPLC

• Todos métodos – Normal CV% 9,6 –16,1%
6,3-16,1 Elevado CV% 6,3 –11,4%

• HPLC - Normal CV% 6,5 –14,5%
5,7-14,5 Elevado CV% 5,7–10,2%

Os métodos automatizados considerados satisfatórios para o doseamento da Hb A₂:
o HPLC e a eletroforese capilar. A eletroforese seguida de densitometria não é considerada aceitável.

CV % Hb A₂, níveis normais e elevados-2011-2014



Doseamento da Hb A₂ - Análise da exatidão

	Hb A ₂ Normal						HLPC-todos						
	Todos os métodos												
	N	Média	Mínimo	Máximo	CV%	% resultados insatisfatórios	N	Alvo peritos	Alvo	Mínimo	Máximo	CV%	% insatisfatórios
2011-amostra liof	22	2,7	1,7	3,2	9,6	0,0	15	-	2,7	2,4	2,9	6,5	0
2012-amostra liof	24	3,2	2,5	4	14,2	22,7	16	3	3,2	2,6	3,9	12	14,3
2013-sangue EDTA	21	2,6	2,1	4,5	10,5	4,8	15	2,6	2,6	2,1	4,5	11,6	6,7
2013-amostra liof	21	3,1	2,3	4	16,1	28,6	15	2,9	3,2	2,3	3,9	14,5	33,3
2014-sangue EDTA	25	3,0	2,5	3,6	10,2	12,0	19	3	3,1	2,7	3,6	8,8	15,8

	Hb A ₂ Elevada						HLPC-todos						
	Todos os métodos												
	N	Alvo	Mínimo	Máximo	CV%	% resultados insatisfatórios	N	Alvo peritos	Alvo	Mínimo	Máximo	CV%	% insatisfatórios
2011-amostra liof	23	4,7	3,9	5,2	6,3	0	17		4,7	3,9	5,2	5,7	0
2013-sangue EDTA	23	4,7	3,8	6	11,4	0	17	4,8	4,8	3,9	5,7	10,2	0
2014-sangue EDTA	26	5,2	4,2	6,1	9,8	0	21		5,2	4,2	6,1	9,1	0

• Amostras normais-4 ensaios, respostas >3, 5 % (limiar para o diagnóstico β tal)

• Hb A₂ nível normal

% resultados insatisfatórios (todos os métodos): 4,8- 28,6%

% resultados insatisfatórios (HPLC): 6,7-33,3 %

Resumo/Discussão

✓ Precisão (AEQ)

HPLC-todos– CV: 5,7 a 14,5%

HPLC (do mesmo fabricante)- CV: 6,0 a 8,0 % (bibliografia)

✓ Percentagem de resultados insatisfatórios

Não se verificou uma diferenciação das amostras normais e patológicas por todos os laboratórios participantes

Todos os métodos : 4,8-28,6 % HPLC: 6,7-33,3 %

✓ Melhoria na qualidade dos doseamentos da Hb A₂

Calibração dos equipamentos, aferição com materiais certificados e avaliação do controlo de qualidade interno , participação em programas de AEQ

✓ Envio de amostras para avaliação técnica dos equipamentos- PNAEQ

Bibliografia – Paleari *et al.* External quality assessment of Hb A₂ measurement: data from an Italian pilot study with fresh whole blood samples and commercial HPLC systems. Clin Chem Lab Med 2007;45:88–92

• Doseamento da hemoglobina Hb A₂, Hb F, Hb S

	Hb F Normal (Hb F ≤ 1%)																
	Todos os métodos					HPLC-todos					Electroforese capilar			Desnaturação alcalina		Electroforese densitometria	
	N	Média	Mínimo	Máximo	CV%	N	Média	Mínimo	Máximo	CV%	N	Média	CV%	N	Média	N	Média
2012- sangue EDTA -	20	0,3	0	0,8	100	18	0,2	0	0,6	100				1	3,7		
2013-sangue EDTA	22	0,6	0	0,9	35	18	0,6	0,4	0,9	24	3	0,3	72,0	-	-	1	0,9
2013- sangue EDTA	18	0,4	0,2	0,9	42	17	0,4	0,2	0,8	37				1	1,5		
2013- sangue EDTA	18	0,2	0	0,8	90	17	0,2	0	0,5	71				1	1,9		
2014- sangue EDTA	21	0,4	0,1	0,9	58	19	0,4	0,1	0,8	55						1	0,9
2014- Liofilizado	19	0,3	0	2	156	16	0,1	0	0,4	58						2	1,05

• A maioria dos laboratórios utiliza HPLC

• Todos os métodos-CV% : 35 a 100

• HPLC- CV% : 24 a 100

• CV % elevados- gama de concentração muito baixa

• Doseamento da hemoglobina Hb A₂, Hb F, Hb S

	Hb F Elevada (Hb F>1%)																
	Todos os métodos					HPLC					Electroforese capilar			Desnaturação alcalina		Electroforese densitometria	
	N	Média	Mínimo	Máximo	CV%	N	Média	Mínimo	Máximo	CV%	N	Média	CV%	N	Média	N	Média
2011-amostra liof	19	1,7	1,5	2	7,9	16	1,8	1,5	2	7,6				1	1,6		-
2011-amostra liof	22	4,7	3,8	5,3	8,7	18	4,9	4,2	5,8	9,9				1	4,2	2	4,4
2012-sangue EDTA	21	1,8	0,7	2,5	24,5	17	2	1,7	2,5	10,4	1	1,1		1	0,3	1	0,8
2012-sangue EDTA	17	4,5	0,6	5,6	23,9	15	4,8	4,1	5,6	10,2	1	3,9		1	14,2	1	0,6
2013-amostra liof	20	1,8	0,6	2,5	24,3	16	2	1,8	2,5	9,0	3	0,9	26,7	-	-	1	3,3
2014 sangue EDTA	24	1,1	0,3	2,1	26,7	20	1,1	0,9	1,3	9,6	2	1,7	-			1	0,3
2014 sangue EDTA	24	2,0	0,9	2,5	19,3	19	2,1	1,8	2,5	10,1	2	1,2				2	1,2

• Todos os métodos -CV% : 7,9% a 26,7%

• HPLC- CV% : 7,6 a 10,4

• Doseamento da hemoglobina Hb A₂, Hb F, Hb S

Hb S

	Todos os métodos			HPLC				Electroforese capilar		Electroforese densitometria	
	N	Média	CV%	N	Alvo peritos	Média	CV%	N	Média	N	Média
2012-sangue EDTA	23	36,6	5,5	15	37,8	37,8	5,9	2	39,6	2	37,1
2013-sangue EDTA	17	37,1	4,8	12	37,9	36,3	5,7	2	39,6	1	37
2014 - Sangue EDTA	23	34,9	3,3	16	34,9	35	3,4	2	36,3	3	34,3
2014 - Sangue EDTA	22	37,8	3,0	15	37,3	37,5	2,8	2	38,3	4	38,2

- A maioria dos laboratórios utiliza HPLC

• Todos os métodos-CV% : 3,0 a 5,5 %

• HPLC- CV% : 2,8 a 5,9

Verifica-se uma melhoria da reprodutibilidade dos resultados em 2014:
CV%- 3,0-3,3 (todos os métodos) e CV%-2,8-3,4 (HPLC)

Experiência PNAEQ: AEQ no âmbito das Hemoglobinopatias

✓ Quantitativos

Avaliação de equipamentos/metodologias:

Hb A2 , Hb F, Hb S

Comparação com laboratórios peritos, CV%, % de corretos (ID)

✓ Qualitativos

Identificação da fração

Comparação com laboratórios peritos e identificação de correto

✓ Casos de estudo

Critérios de seleção: interesse clínico e disponibilidade de amostras

Análise das respostas e comentários dos laboratório peritos:

Qualificação na interpretação de resultados

Avaliação de conhecimentos e competências

- **Hemoglobinopatias: Identificação das frações de hemoglobina-2011-2014: 8 ensaios, 13 amostras**

2011-2014			
Identificação da fração - correto	Nº amostras	% Resultados corretos	Incorreção
A ₂ -F-A	8	48 - 88,9	Não identificação Hb A Não identificação Hb F Identificação de Hb C
A ₂ -F-A-S	4	36,8 - 70,8	Não identificação Hb A Não identificação Hb F e/ou Hb A ₂ Não identificação Hb S
A ₂ -F-A-	1	32	Não identificação Hb A ₂ e/ou Hb F Não identificação Hb Lepore

■ = Outra fração. Especifique qual.

Insatisfatórios:

- **Não identificação da presença** de Hb A, que constitui um requisito importante, pois distingue o portador, das situações clinicamente graves
- Não identificação da hemoglobina variante presente na amostra

Hemoglobinopatias-Casos estudo/Amostras com interpretação resultados

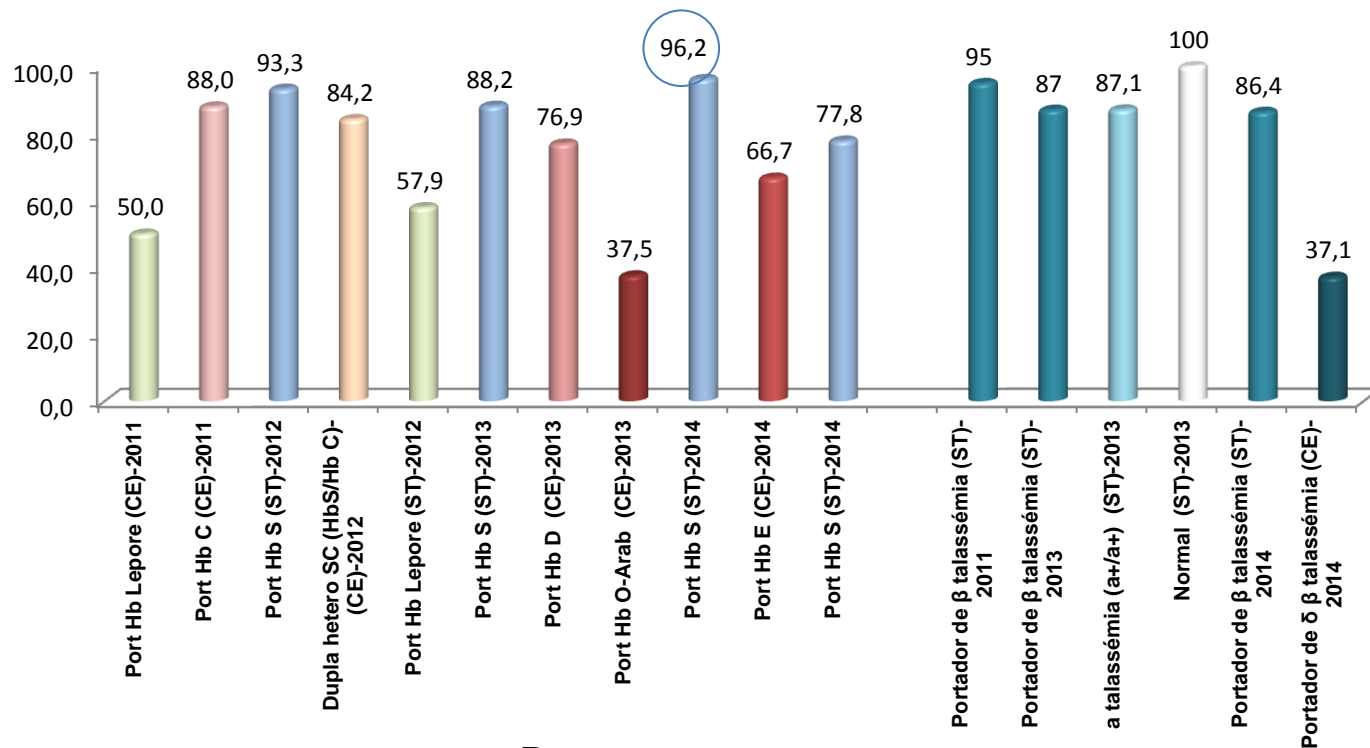
2011-2014: 7 casos estudo e 10 amostras de sangue total para avaliação técnica e interpretação laboratorial

11 portadores de variantes Hb, 3 port β tal, 1 port de $\delta\beta$ tal, 1 homozigotia α^+ tal e 1 normal.

		Interpretação correta - Laboratórios peritos	Interpretação correta %
Caso estudo	1	Portador de Hemoglobina Lepore	50,0
Sangue EDTA	1	Portador de Hemoglobina Lepore	57,9
Caso estudo	1	Portador de hemoglobina C	88,0
Caso estudo	1	Portador de hemoglobina D	76,9
Caso estudo	1	Portador de hemoglobina O-Arab	37,5
Caso estudo	1	Dupla heterozigotia SC (Hb S + Hb C)	84,2
Sangue EDTA	4	Portador de hemoglobina S	77,8- 96,2
Caso estudo	1	Portador de Hemoglobina E	66,7
Sangue EDTA	3	Portador de β talassémia	86,4-95,0
Sangue EDTA	1	α talassémia (α^+/α^+)	87,1
Caso estudo	1	Portador de $\delta\beta$ talassémia	37,1
Sangue EDTA	1	Sem evidência de variante de Hb ou talassémia-Normal	100

Hemoglobinopatias-Casos estudo: interpretação resultados/diagnóstico laboratorial

% de Diagnósticos laboratoriais corretos : 11 portadores de variantes Hb, 3 port β tal ,1 port de $\delta\beta$ tal, 1 homozigotia α^+ tal e 1 normal.



Resumo

- ✓ Hb O-Arab e Hb Lepore: Variantes Hb com menor % de corretos
- ✓ Hb S – variante de Hb que apresentou melhor desempenho
- ✓ Talassemias - $\delta\beta$ talassemia com menor % de corretos

Conclusões

Laboratório

Realização de CQI e AEQ para monitorização da reprodutibilidade e da exatidão analítica

Calibração dos equipamentos, aferição com materiais certificados.

Organizadores dos programas AEQ

Envio de amostras para avaliação técnica dos equipamentos- PNAEQ

Envio de amostra com variantes Hb associadas a risco genético- PNAEQ

A monitorização do desempenho permite o conhecimento do estado da arte atual e posterior comparação com os pares internacionais



PNAEQ

Grupo de trabalho de Hematologia

Grupo laboratório Hemoglobinopatias

O que é a Acreditação?

A acreditação de ensaios de **análises clínicas** corresponde a um reconhecimento independente **da qualidade e competência técnica dos resultados.**



Para que serve a Acreditação?

Ganhar e transmitir confiança na execução de determinadas atividades técnicas, ao confirmar a existência de um nível de competência técnica mínimo, reconhecido internacionalmente.

Metodologias utilizadas na caracterização analítica do fenótipo Hemoglobinopatias:

✓ Hemograma- eritrograma com índices eritrocitários

Hb, GV, HGM,VGM e RDW

Cut-off portadores talassêmia: HGM<27 pg e VGM <80 fL

✓ Técnicas electroforéticas

Focagem isoelétrica em gel de poliacrilamida- Detecção e identificação de hemoglobinas variantes

✓ Técnicas cromatográficas

HPLC de troca iônica da hemoglobina- Quantificação da Hb A₂ e da Hb F

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

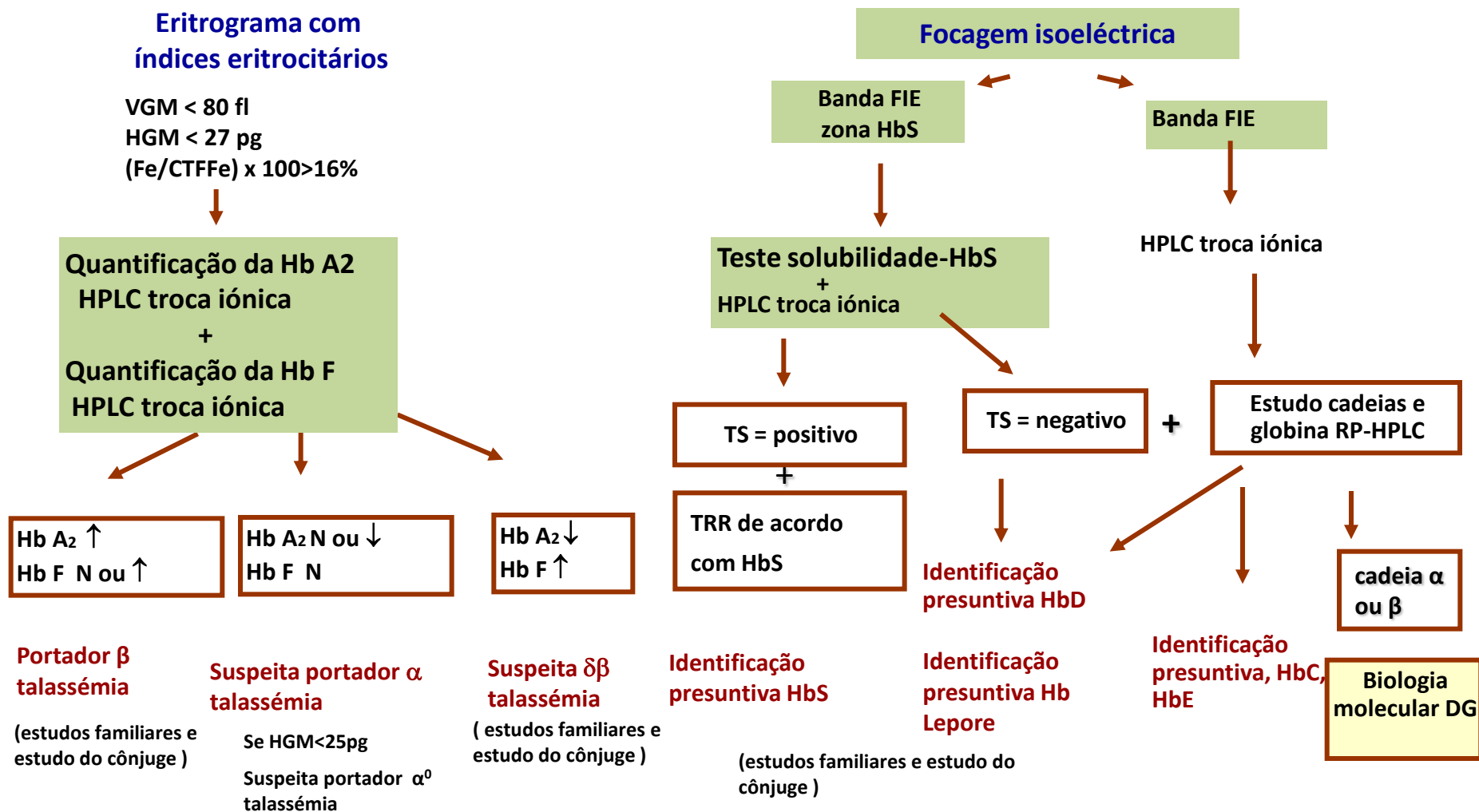
✓ Estudos funcionais da Hb

Teste de solubilidade da HbS- confirmação da presença de Hb S

Teste de estabilidade - Teste do isopropanol

Pesquisa de corpos de inclusão de Hb H

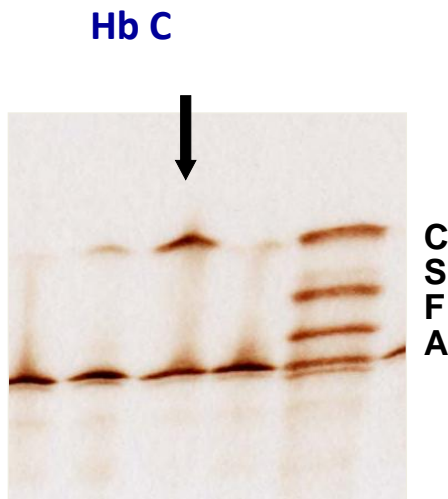
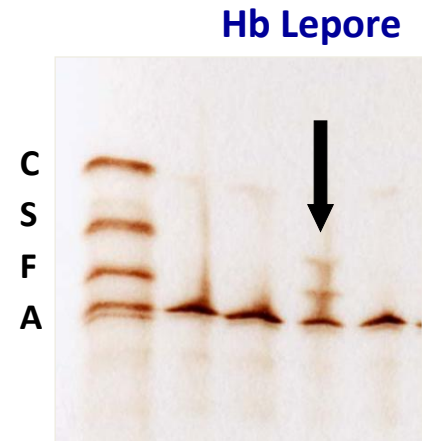
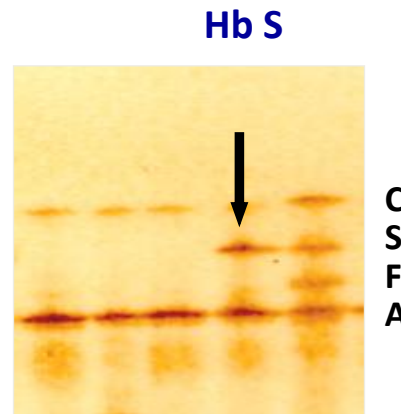
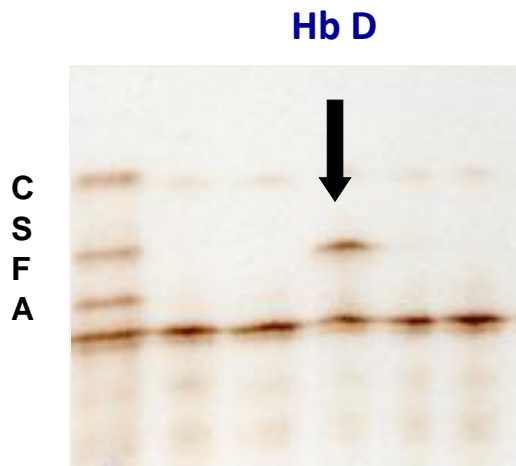
Fluxograma do diagnóstico laboratorial



✓ Técnicas electroforéticas

Focagem isoeléctrica em gel de poliacrilamida

técnica de electroforese em gel de poliacrilamida, que permite a separação de proteínas de acordo com o seu ponto isoeléctrico.



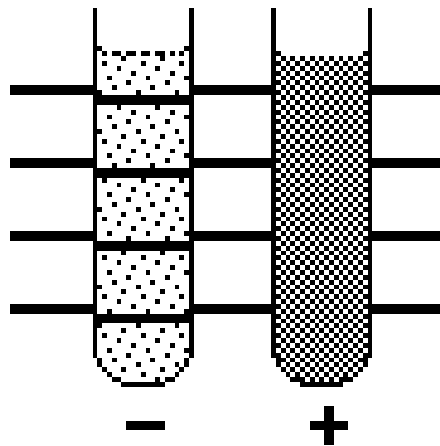
✓ Estudos funcionais da Hb

Teste de solubilidade da HbS

Teste de estabilidade - Teste do isopropanol

Pesquisa de corpos de inclusão de Hb H

Teste qualitativo que se baseia no facto da Hb S na sua forma desoxigenada (reduzida) polimerizar quando em solução de fosfatos de alta molaridade contendo um agente redutor (ditiórito de sódio).

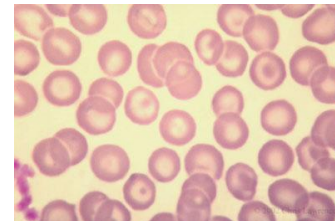


Positivo

A detecção de portadores de β talassemia caracteriza-se por:

- diminuição do VGM e HGM
- aumento da Hb A₂ (4-6%)

Hb=12,6 g/dL
G.V.= $6,21 \times 10^{12}/L$
Hct=0,386
VGM=62,2 fL
HGM=20,3 pg
CHGM=32,6 g/dL
RDW=16,4%



Esfregaço de sangue periférico após coloração - GV microcíticos, hipocrômicos

Quantificação da Hb A₂-Precisão e Exatidão

- ✓ Identificação de Portadores de β talassemia- Rastreio pré-natal
- ✓ Identificação de casais em risco
- ✓ Pequena diferença entre valores normais e elevados

Portadores de β tal atípicos:

- índices eritrocitários próximos do normal
- valores de Hb A₂ *borderline* (3,3-3,8%) tornam o diagnóstico mais difícil)

Determinações fiáveis com alto grau de reprodutibilidade e exatidão

Quantificação da Hb F

Condições com Hb F aumentada:

- **Fisiológicas**

Recém-nascidos

Gravidez

- **Hereditárias**

- $\delta\beta$ talassemia**

- β talassemia (alguns casos)

- β talassemia *major* and intermédia

- Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal**

- Drepanocitose- tratamento com hidroxiureia**

- Variantes de hemoglobina instáveis de cadeia β

- **Adquiridas (Hb F vezes aumentada)**

- Leucemia

- Mielodisplasia

- Recuperação de hipoplasia da medula óssea

✓ Técnicas cromatográficas

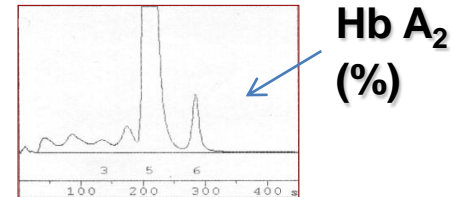
HPLC de troca iônica da hemoglobina

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

Separa as hemoglobinas com base na sua carga global

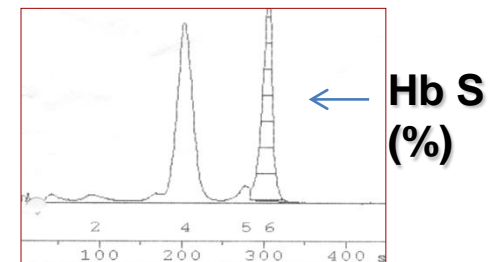
Frações normais :

- ✓ Quantificação relativa dos níveis de Hb A₂ – **Port β tal**
- ✓ Quantificação relativa dos níveis de Hb F– **Port $\delta\beta$ tal e HPFH**



Frações anómalas:

- ✓ Quantificação e Identificação presuntiva **de variantes de Hb** intervalos de tempos de retenção previamente estabelecidos: **Hb S, Hb D, Hb C, Hb E.**



Norma Portuguesa

NP
EN ISO 15189
2014

Laboratórios clínicos
Requisitos para a qualidade e competência
(ISO 15189:2012)

Laboratoires de biologie médicale
Exigences concernant la qualité et la compétence
(ISO 15189:2012)

Medical laboratories
Requirements for quality and competence
(ISO 15189:2012)

ICS
11.100

CORRESPONDÊNCIA
Versão portuguesa da EN ISO 15189:2012

HOMOLOGAÇÃO
Termo de Homologação n.º 258/2014, de 2014-11-17
A presente Norma resultou da revisão da
NP EN ISO 15189:2012 (Ed. 1)

ELABORAÇÃO
CT 87 (APORMED)

2ª EDIÇÃO
2014-12-15

CÓDIGO DE PREÇO
2016

© IPQ reprodução proibida

Instituto Português da **Q**ualidade

Rua António Gálvez, 2
2629-513 CAPARECA PORTUGAL

Tel. +351-212 948 180 Fax +351-212 948 181
Email: ipa@ipa.pt Internet: www.ipa.pt

Norma Portuguesa

NP
EN ISO 15189
2014

Laboratórios clínicos
Requisitos para a qualidade e competência
(ISO 15189:2012)



As não conformidades(NC):

ISO15189 5.1 No procedimento de Avaliação Técnica do Pessoal – DPSUDR PE 43_02L, não estava definido de forma clara qual o critério em vigor para efeitos de desclassificação de um técnico no que diz respeito à execução de ensaios (MF).

ISO15189 5.3 O plano de manutenção e calibração para 2015 não tinha sido cumprido (e.g. balança Sartorius 1006-408 e Frigorífico 1006-096).(MF)

94 N LC -Todos-ISO15189 5.5 As massas de reagentes a pesar indicadas no procedimento da prova de solubilidade não correspondiam às descritas no documento utilizado como referência (Laboratory methods for detecting hemoglobinopathies - CDC, USA, 1984) (MF)

151 N LC - Todos- ISO15189 5.1 Não se encontrava definida a experiência profissional adequada área técnica para o Responsável Técnico (DPS)

As oportunidades de melhoria:

5 LC - Todos- ISO15189 5.5 Recomenda-se que no procedimento de ensaio correspondente à prova de solubilidade seja feita referência às molaridades finais a obter nas soluções de reagentes a preparar (MF)

ISO15189 5.5 Recomenda-se que a informação relativa à validação dos ensaios seja sistematizada sob a forma de relatório uma vez que a mesma se encontra atualmente dispersa por vários documentos (MF).

Validação dos procedimentos de exame

obrigada



Filomena Seuanes

Sandra Copeto

Maria Teresa Seixas

Sandra Costa

Gisela Gaspar



Colegas do PNAEQ e Grupo de trabalho de Hematologia

Colegas do Departamento de Genética Humana