

# Paralela 2:Diagnóstico Laboratorial

## Diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias

**Armandina Miranda**

**Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge**

**27 de maio 2019, Maputo**

**[armandina.miranda@insa.min-saude.pt](mailto:armandina.miranda@insa.min-saude.pt)**

# Agenda

---

## Diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias

- ✓ Hemoglobina (Hb)

Genética da síntese da Hb

- ✓ Hemoglobinopatias

Classificação das hemoglobinopatias

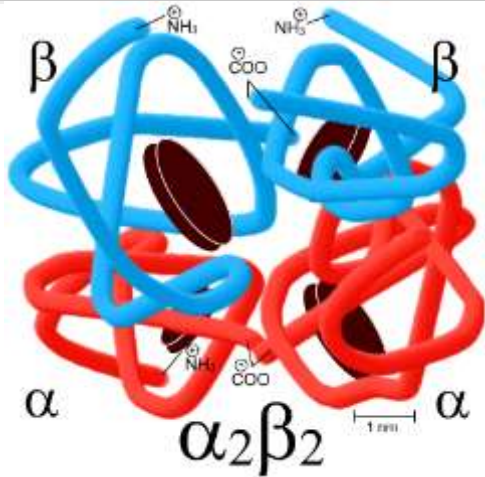
Prevalência e distribuição geográfica

Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

Síndromes drepanocíticas- drepanocitose

PNAEQ- Ensaio hemoglobinopatias

# Hemoglobina



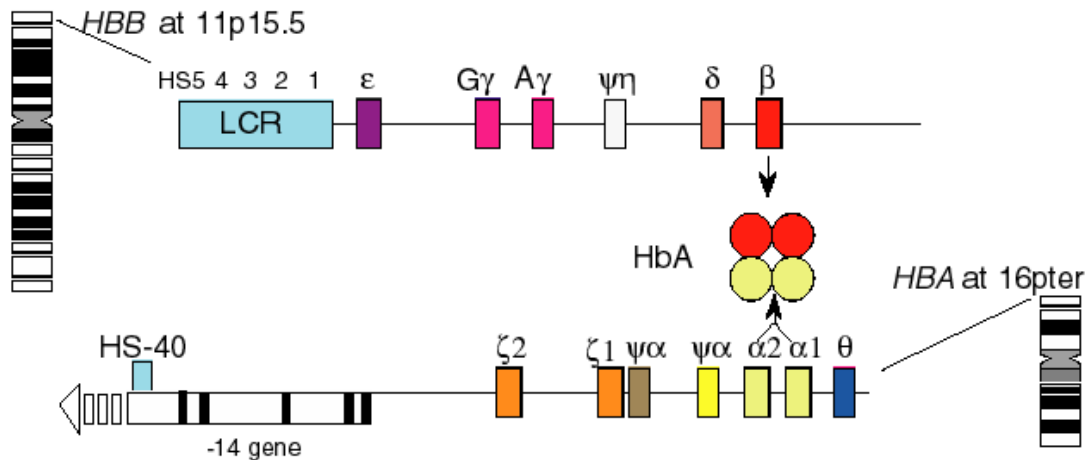
## Parte proteica

2 cadeias tipo  $\alpha$

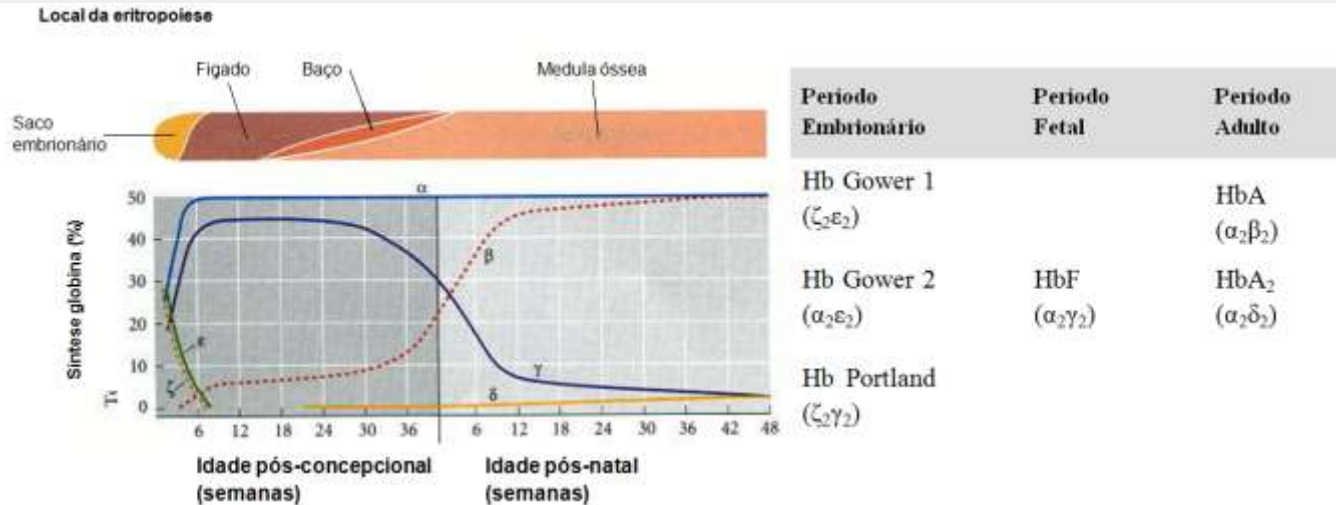
2 cadeias tipo não  $\alpha$

Grupo prostético:

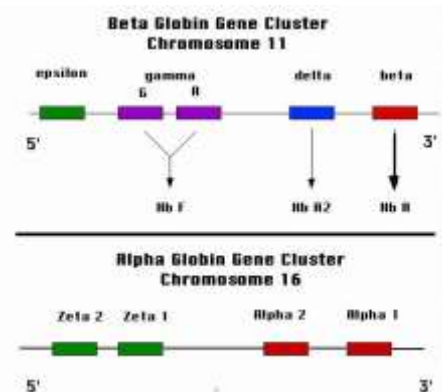
4 heme



# Hemoglobinas humanas nos diferentes períodos do desenvolvimento



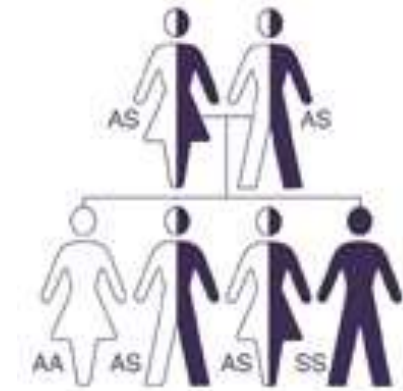
## Hemoglobinas humanas na vida adulta



Hemoglobina	cadeias	percentagem
<b>Hb A</b>	$\alpha_2\beta_2$	96 a 98 % da Hb total
<b>Hb A<sub>2</sub></b>	$\alpha_2\delta_2$	2 a 3,0 % da Hb total
<b>Hb F</b>	$\alpha_2\gamma_2$	< 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 :

## ✓ Talassemias

Resultam da diminuição ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias de globina. Ex  $\beta$ -talassemia,  $\alpha$ -talassémia

## ✓ Variantes estruturais

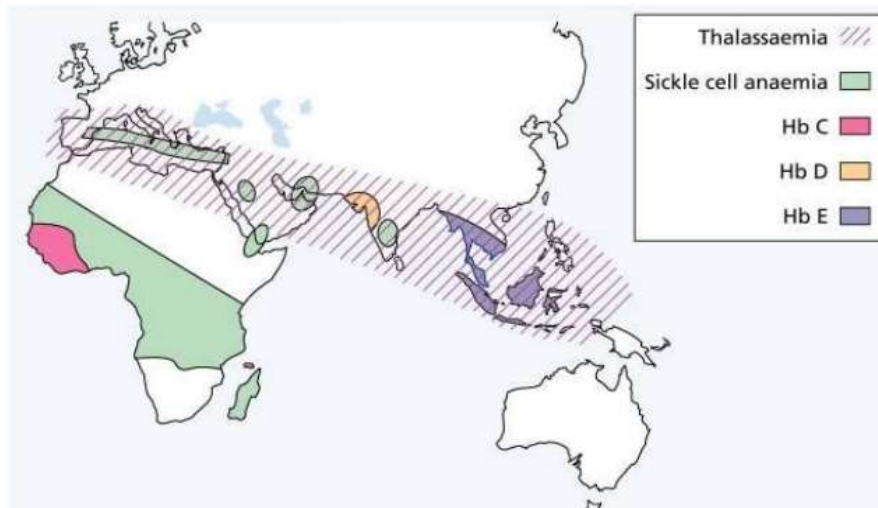
Hemoglobinas de estrutura anómala- 95% devidas à substituição de um aminoácido, Ex Hb S, Hb C, Hb D, Hb E, Hb Lepore

## ✓ HPFH

Persistência Hereditária de Hb fetal

# Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são comuns nas populações de áreas onde a malária era endêmica



Distribuição geográfica das talassemias e das variantes estruturais mais comuns

África,  
bacia do Mediterrâneo,  
Médio Oriente,  
Ásia



Mobilidade e migrações de populações, as hemoglobinopatias difundiram-se  
**um problema de saúde pública global**

**A drepanocitose e a  $\beta$ -talassemia constituem as doenças monogénicas humanas mais comuns e representam um grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo**

# Hemoglobinopatias

**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**

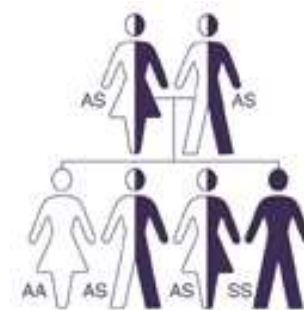
# Hemoglobinopatias

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

- Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias de casais em risco rastreios e confirmações em colaboração com laboratórios de saúde pública, e outras entidades de saúde, públicas e privadas**

laboratório diferenciado na área das hemoglobinopatias (acreditado ISO NP 15189-2014)

Colaboração com laboratório de diagnóstico molecular e de investigação



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

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



# Hemoglobinopatias

## □ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

➤ 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



# Hemoglobinopatias

□ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

➤ **Fase pré-analítica-**

análise requisição

Inquérito

colheita amostra

transporte da amostra

conservação da amostra

## *Atividades :*

- **Atendimento do doente-** preenchimento de inquérito – idade, sexo, gravidez em curso, origem geográfica, hemoglobinopatias na família
- **Colheita da amostra-** sangue total colhido em EDTA- Identificação dos tubos de colheita
- **Manuseamento da amostra-** quantidade adequada
- **Transporte amostra-** preferencialmente refrigerada, estabilidade da amostra
- **Recepção da amostra**
- **Armazenamento da amostra-** refrigerada, estabilidade da amostra

# Hemoglobinopatias

- ❑ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

➤ Fase analítica

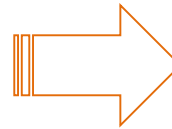
processamento e exame de amostras biológicas



## ✓ Procedimento de controlo da qualidade interno:

### *Amostras controlo:*

- Tipo de amostras:
  - Comerciais
  - Não comerciais- utentes



Teste quantitativos

Teste qualitativos

### *Realização do controlo de qualidade analítico :*

- Frequência
- Interpretação dos resultados (regras e critérios)
- Ações corretivas para resolução dos problemas

## ✓ Procedimento de participação em AEQ

## ✓ Formação técnica

# Hemoglobinopatias

❑ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

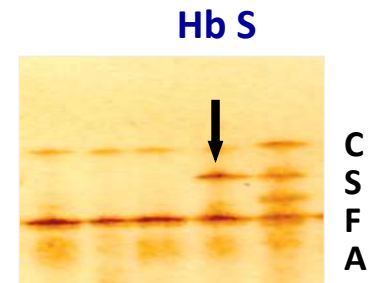
## ✓ Hemograma- eritrograma com índices eritrocitários

$$\text{Hb, GV, HGM, VGM e RDW} \quad \text{MCV (fl)} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Total eritrócitos}} \quad \text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Total eritrócitos}}$$

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

## ✓ Técnicas electroforéticas

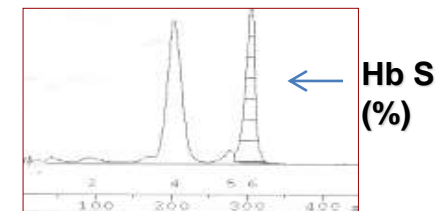
Focagem isoeléctrica em gel de poliacrilamida



## ✓ Técnicas cromatográficas

HPLC de troca iónica da hemoglobina

HPLC de fase reversa das cadeias de globina



## ✓ Estudos funcionais da Hb

Teste de solubilidade da HbS

Pesquisa de corpos de inclusão de Hb H



Positivo

# Hemoglobinopatias

- Detecção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## Índices eritrocitários

Hb= 14,6 g/dL Ht =43% GV=4,9x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>

$$\text{MCV (fl)} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Total eritrócitos}}$$

Ex: 43x10/4,9

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Total eritrócitos}}$$

Ex: 14,6x10/4,9

$$\text{MCHC (g/dL)} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

Ex: 14,6x100/43

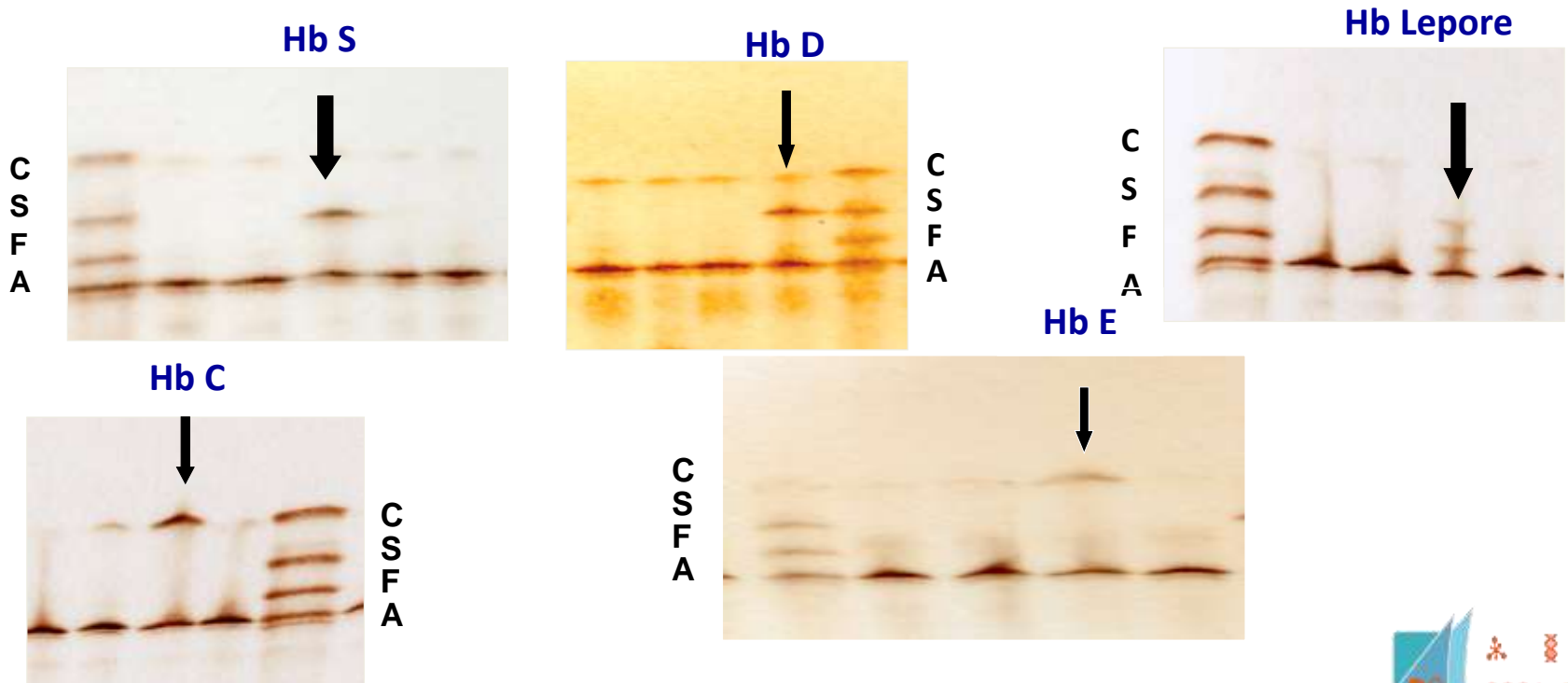
# Hemoglobinopatias

☐ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## ✓ 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.

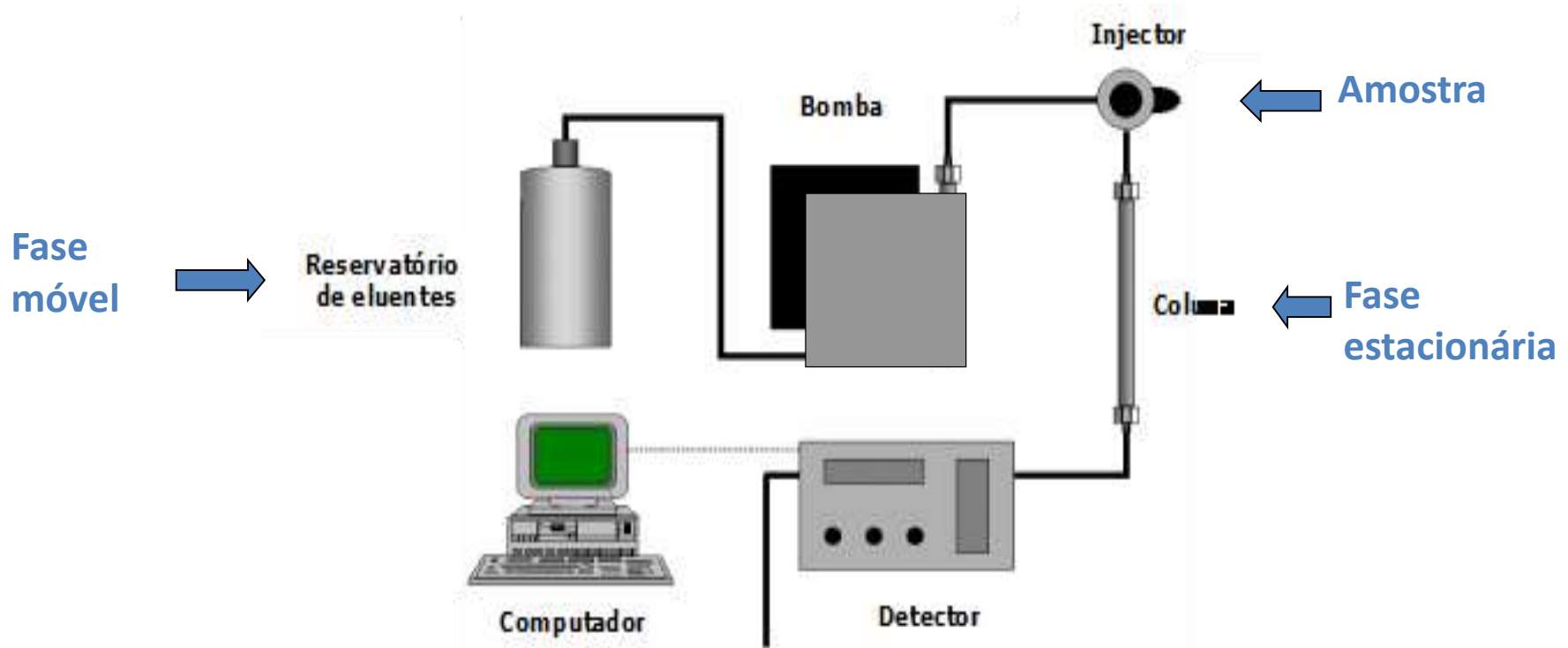


# Hemoglobinopatias

- ❑ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## ✓ Técnicas cromatográficas

**A HPLC utiliza instrumentos sofisticados, que podem ser totalmente automáticos**



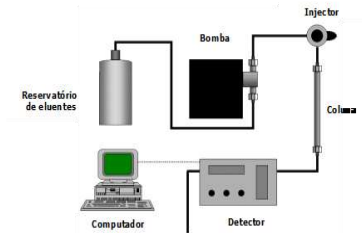
Representação esquemática de um cromatógrafo de HPLC

# Hemoglobinopatias

❑ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

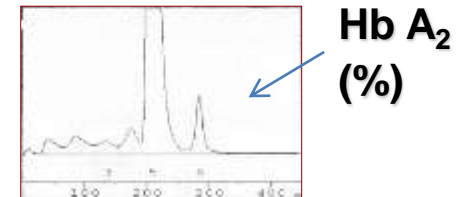
✓ Técnicas cromatográficas

Separa as hemoglobinas com base na sua carga global



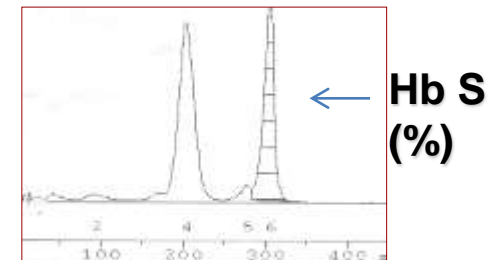
Frações normais :

- ✓ Quantificação relativa dos níveis de Hb A<sub>2</sub> – Port  $\beta$  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.

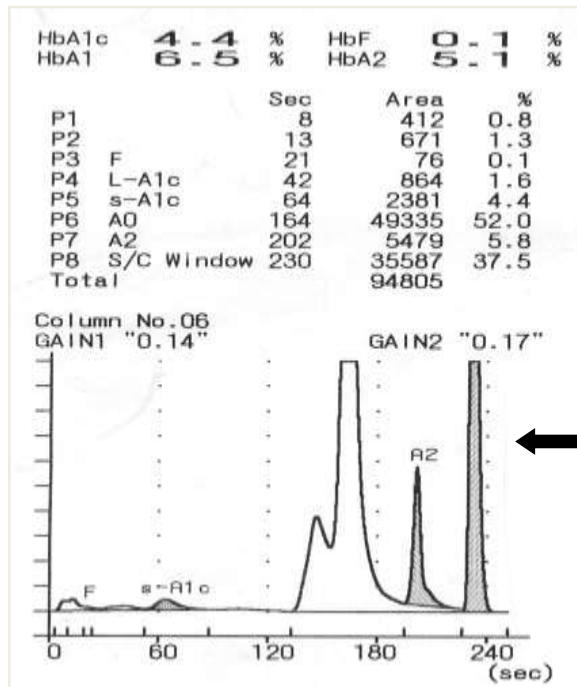


# Hemoglobinopatias

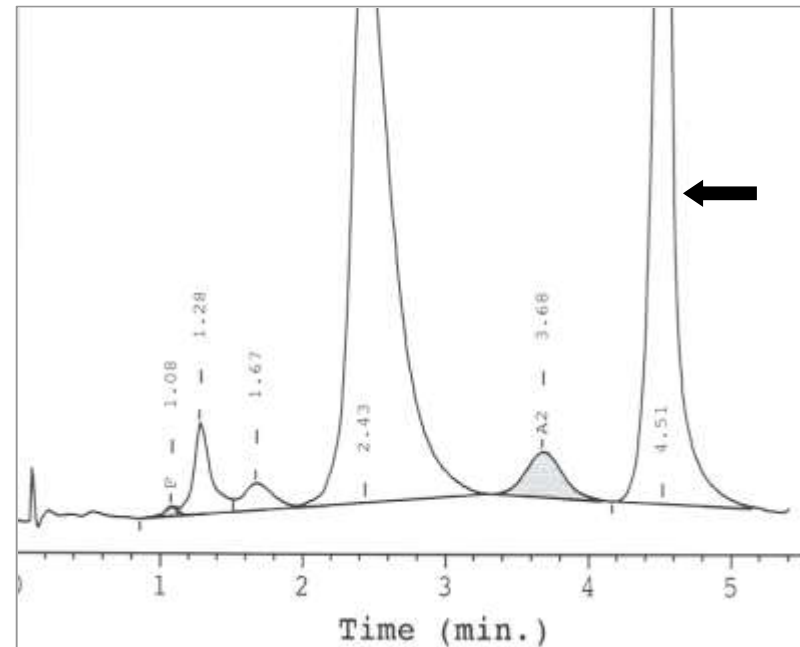
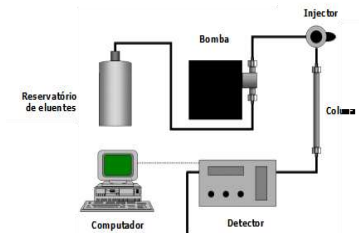
☐ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## ✓ Técnicas cromatográficas

### HPLC troca iônica



HPLC – HA 8160



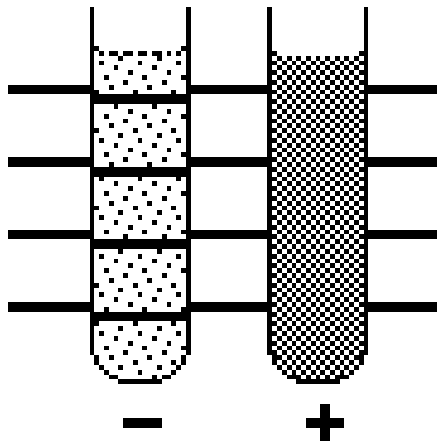
HPLC – Variant II

# Hemoglobinopatias

☐ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## ✓ Estudos funcionais da Hb

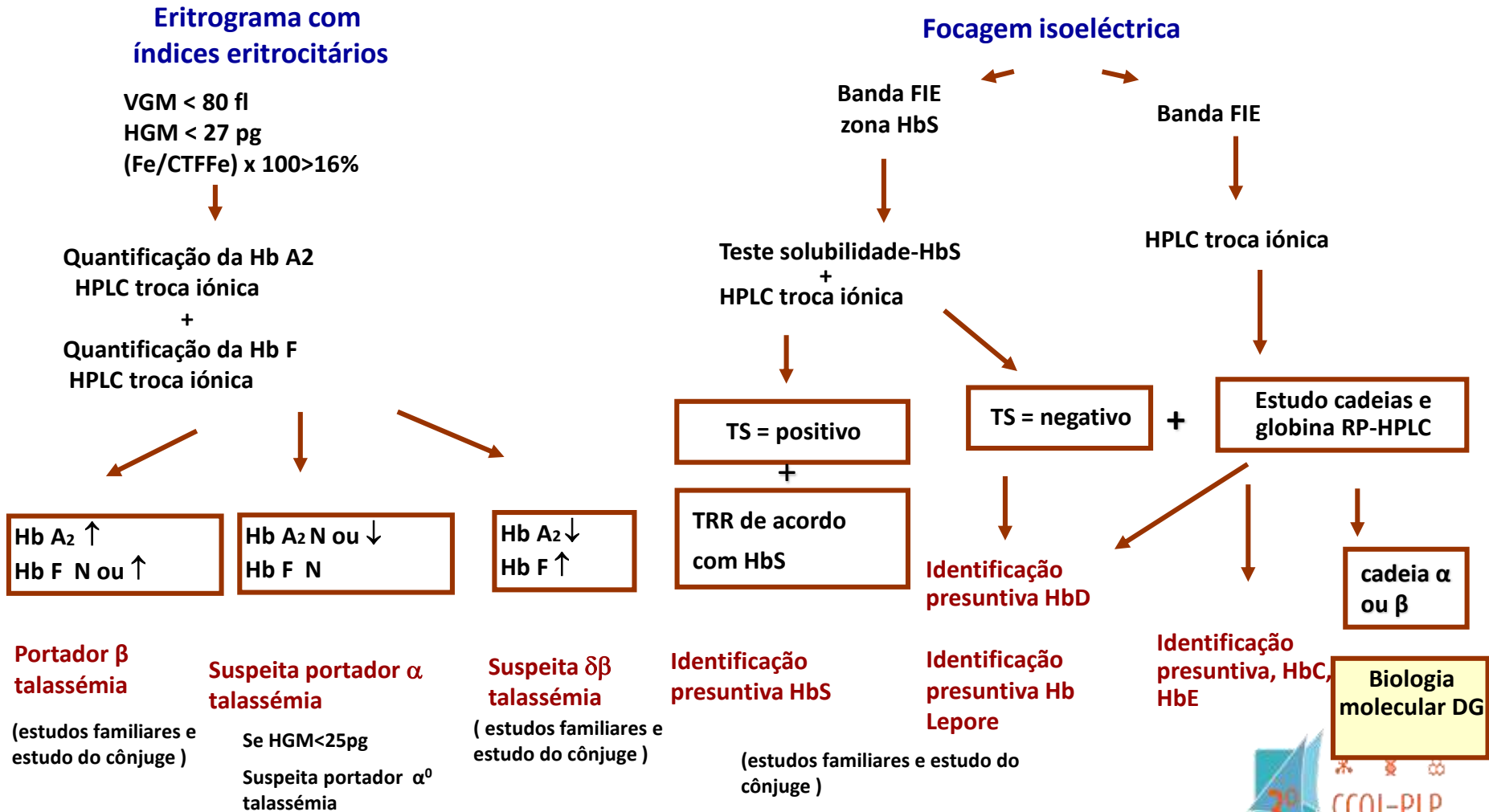
Teste qualitativo que se baseia no facto da Hb S na sua forma desoxigenada (reduzida) polimerizar quando em solução de fosfatos de alta molaridade contendo um agente redutor (ditionito de sódio).



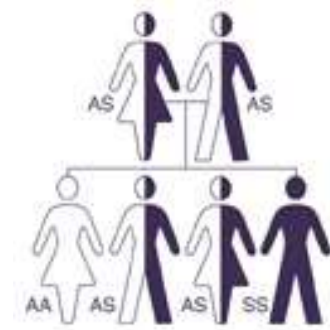
Positivo

# Hemoglobinopatias

## □ Detecção e identificação de portadores de hemoglobinopatias



# Hemoglobinopatias



## ☐ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

**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										
Carrier of:		Hb S	$\beta$ -thalassaemia	$\delta\beta$ -thalassaemia	Hb Lepore	Hb E	Hb O <sub>A</sub> rab	Hb C	Hb D <sub>Punjab</sub>	HPFH*	$\alpha^0$ -thalassaemia	$\alpha^+$ -thalassaemia
Father	Hb S	■		■	■				■	■		
	$\beta$ -thalassaemia	■	■		■	■						
	$\delta\beta$ -thalassaemia	■	■	■	■							
	Hb Lepore	■	■	■	■							
	Hb E	■	■	■	■							
	Hb O <sub>A</sub> rab	■		■								
	Hb C	■										
	Hb D <sub>Punjab</sub>	■										
	HPFH*	■										
	$\alpha^0$ -thalassaemia										■	■
	$\alpha^+$ -thalassaemia										■	



Serious risk: to offer counselling and antenatal diagnosis



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



No risk

# Hemoglobinopatias

□ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## ➤ Fase pós-analítica

### ✓ Validação

Resultados CQI e AEQ

### ✓ Interpretação

Informação do utente

Correlação de resultados de pelo menos 2 metodologias

### ✓ Emissão do relatório

Cumprimento dos requisitos normativos

Emitido em tempo útil

validação  
interpretação  
emissão relatório



# Hemoglobinopatias

☐ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## Portador de Hb S

Sexo: F  
Idade: 33 anos  
Origem: -

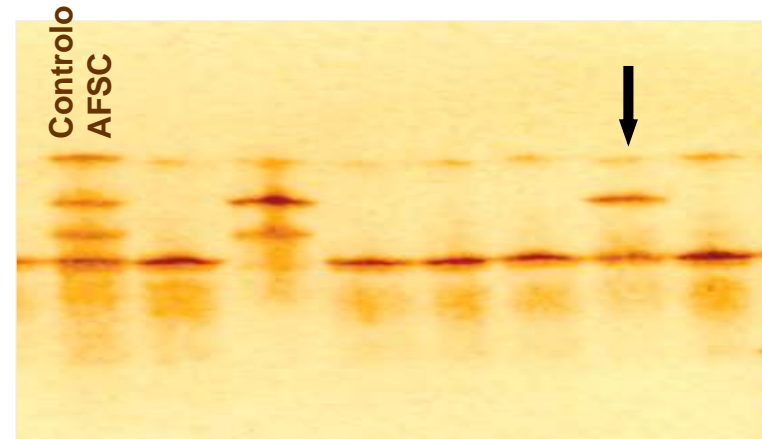
### Hemograma

Hb=12,4 g/dL  
G.V.= $4,52 \times 10^{12}/L$

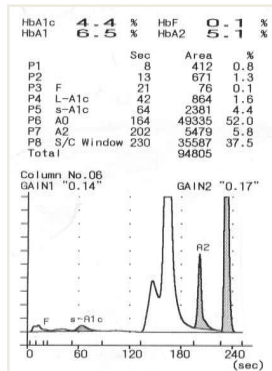
Hct=0,379  
VGM=83,9 fL

HGM=27,5 pg  
CHGM=32,7g/dL  
RDW=13,7%

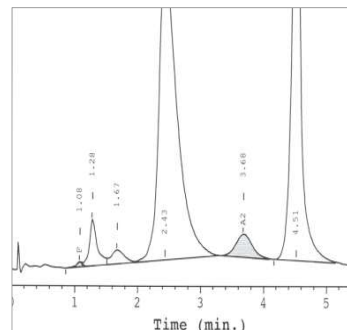
### Focagem Isoelétrica



### HPLC troca iónica



HPLC - HA 8160



HPLC - Variant II

### Teste de solubilidade:

Positivo



# Hemoglobinopatias

☐ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

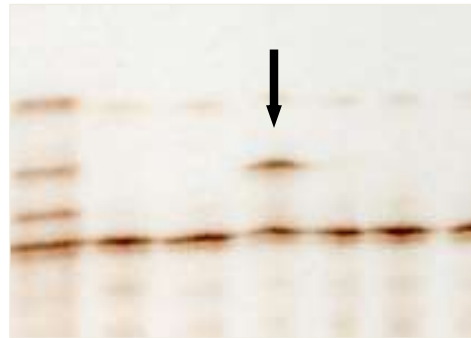
## Portador de Hb D

Sexo- F  
Idade-adulto  
Origem Geog.-Beja

### Hemograma

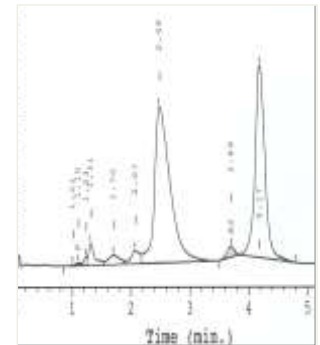
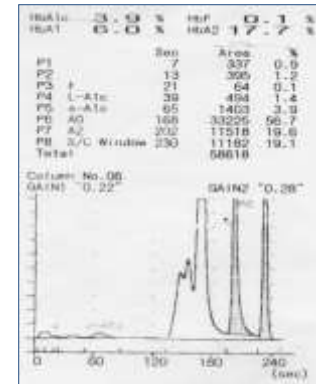
Hb=13,2g/dL  
G.V.= $4,07 \times 10^{12}/L$   
Hct=0,399  
VGM=98,1 fL  
HGM=32,5pg  
CHGM=33,1 g/dL  
RDW=12,3%

### Focagem Isoelétrica

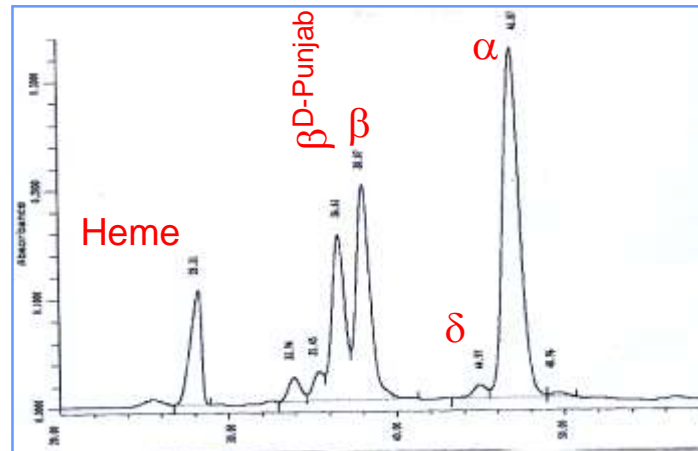


C  
S  
F  
A

### HPLC – troca iónica



### HPLC de Fase Reversa das cadeias de globina



Área  $\alpha$  = 370,025  
Área não  $\alpha$  = 378,854

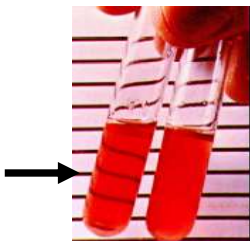
Variante Hb cadeia  $\beta$

TRR =  $\text{tr } \beta^x / \text{tr } \beta$

Hb D-Punjab = 40,9%

### Teste de solubilidade:

Negativo.



# Hemoglobinopatias

☐ Detecção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## Portador de Hb C

### Amostra

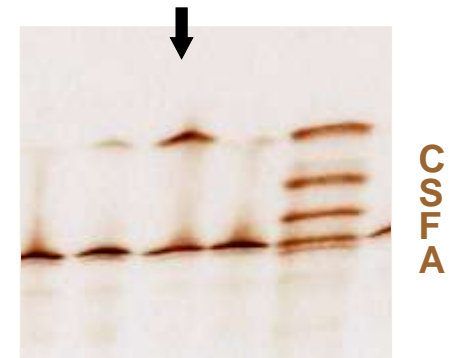
Sexo-F  
Idade-32 anos

### Hemograma

Hb=13,4 g/dL  
G.V.= $4,16 \times 10^{12}/$   
Ht=0,399  
VGM=95,8 fL  
HGM=32,1 pg  
CHGM=33,5 g/dL  
RDW=12,9%

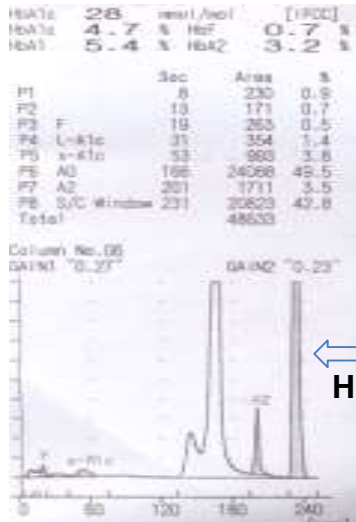
### Focagem Isoelétrica

### Hb C

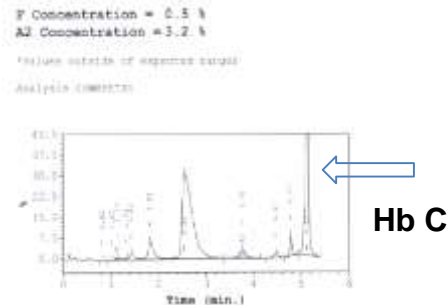


### Cromatogramas

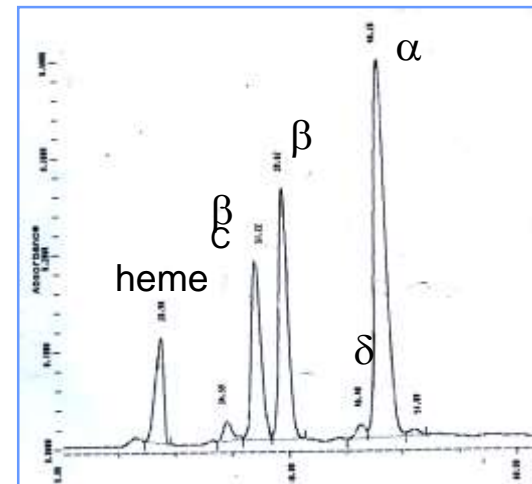
### HPLC – HA 8160



### HPLC – Variant II da Biorad



### HPLC de Fase Reversa das cadeias de globina



Área  $\alpha$  = 447,387  
Área não  $\alpha$  = 445,037

Variante Hb cadeia  $\beta$

$TRR = \frac{tr \beta^x}{tr \beta}$

Hb C = 40,2%

# Hemoglobinopatias

☐ Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## Portador de Hb E

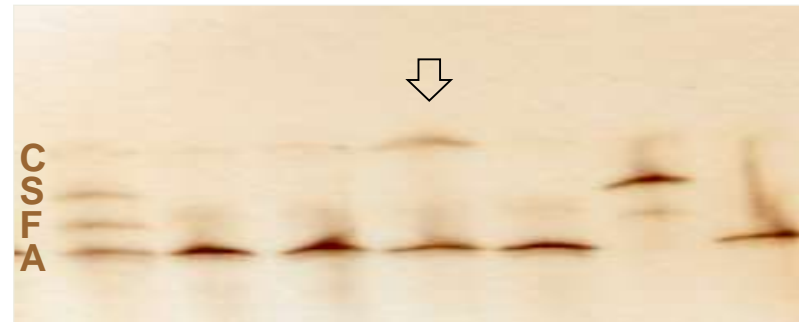
### Amostra

Sexo: M  
Idade: 44 anos  
Origem: -

### Hemograma

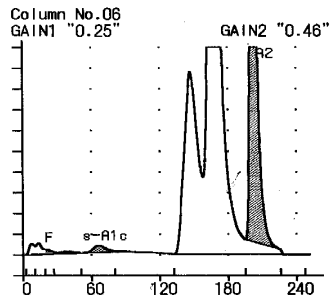
Hb=14,5 g/dL  
G.V.= $5,61 \times 10^{12}/L$   
Hct=0,418  
VGM=74,5 fL  
HGM=25,2 pg  
CHGM=33,8 g/dL  
RDW=13,3%

### Focagem Isoelétrica



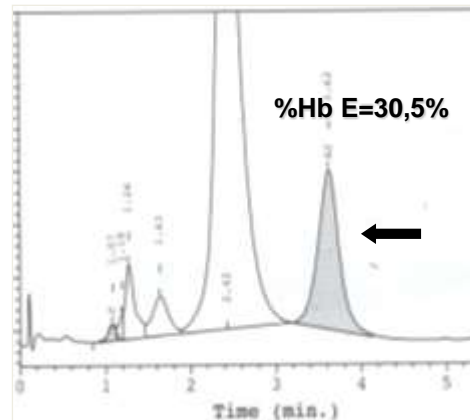
### HPLC – HA 8160

HbA1c	3.1	%	HbF	0.3	%
HbA1	5.1	%	HbA2	21.9	%
P1	8	356	0.9		
P2	14	433	1.1		
P3	21	138	0.3		
P4	39	345	0.9		
P5	66	1200	3.1		
P6	88	26	0.1		
P7	168	36353	70.9		
P8	202	12396	24.2		
Total		51247			

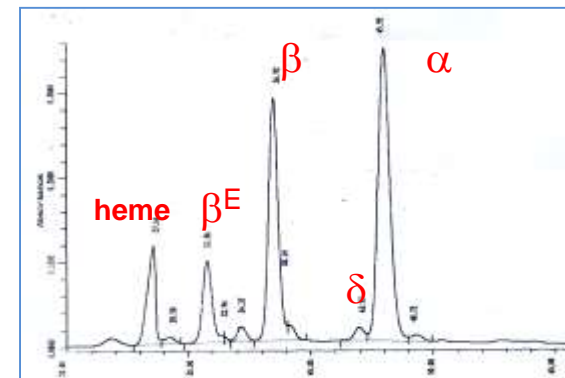


### Cromatogramas

#### HPLC – Variant II da Biorad



#### HPLC de Fase Reversa das cadeias de globina



# Hemoglobinopatias

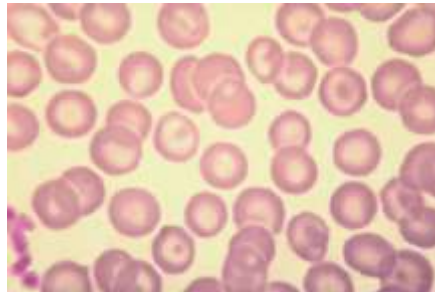
□ Detecção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

## Portador de beta- talassemia

Sexo: M  
Idade: adulto  
Origem: caucasiana

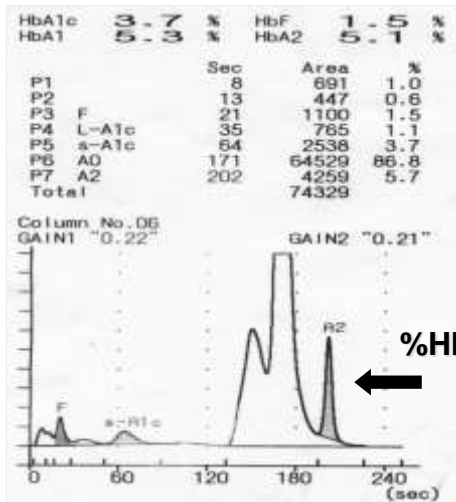
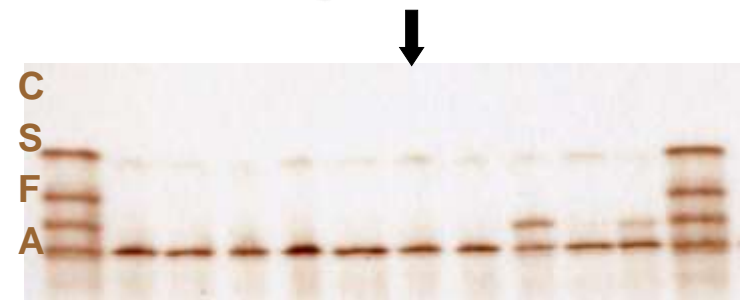
### Hemograma

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%



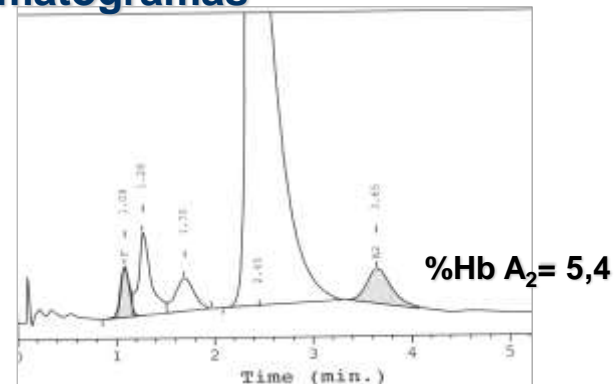
Esfregaço de sangue periférico após coloração - GV microcíticos, hipocrômicos

### Focagem Isoelétrica



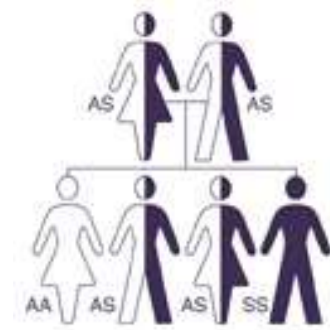
HPLC - HA 8160

### Cromatogramas



HPLC - Variant II

# Hemoglobinopatias



**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										
Carrier of:		Hb S	$\beta$ -thalassaemia	$\delta\beta$ -thalassaemia	Hb Lepore	Hb E	Hb O <sub>Arab</sub>	Hb C	Hb D <sub>Punjab</sub>	HPFH*	$\alpha^0$ -thalassaemia	$\alpha^+$ -thalassaemia
Father	Hb S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	$\beta$ -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	$\delta\beta$ -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb Lepore	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb E	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb O <sub>Arab</sub>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb D <sub>Punjab</sub>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	HPFH*	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	$\alpha^0$ -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	$\alpha^+$ -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

- Serious risk: to offer counselling and antenatal diagnosis
- Less serious risk: to offer counselling and further investigation maybe required
- No risk

# Hemoglobinopatias

## Drepanocitose

### Genética:

Doença genética, hereditária de transmissão autossômica recessiva

Mutação GAG > GTG , no codão 6 do gene  $\beta$ -globina



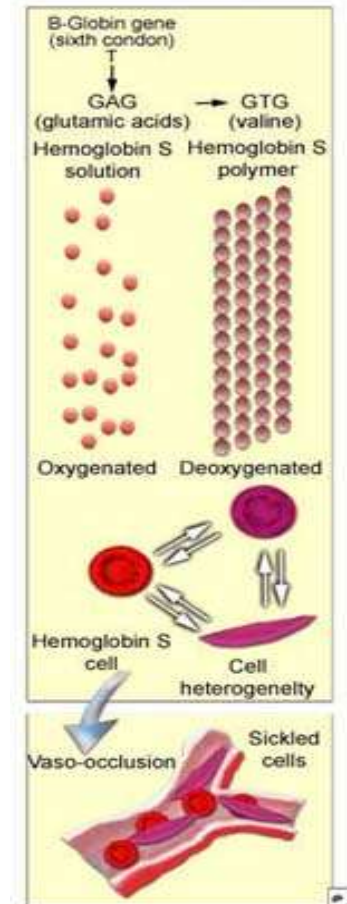
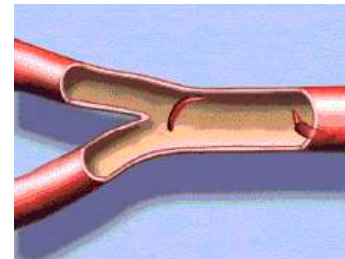
Substituição de um ac.glutâmico > valina ,  
6º aminoácido da cadeia  $\beta$ -globínica.

### Fisiopatologia:

O evento primário da patogénese da drepanocitose é a polimerização da HbS, em condições de desoxigenação

Distorção do GV ,  $\downarrow$  flexibilidade,  $\uparrow$  adesão paredes vasos sanguíneos

Vaso-oclusão  
hipoxia tecidual  
Lesão multiorgânica



# Hemoglobinopatias

## Drepanocitose

### Apresentação Clínica:

- Anemia hemolítica crónica
- AVC
- Síndrome torácica aguda
- Crises dolorosas
- Alterações da função renal e esplénica
  
- Susceptibilidade às infecções
- Ulceração das pernas
- Necrose avascular dos pequenos ossos das mãos e pés (dactilites).
  
- Necrose avascular da cabeça do fémur
- priapismo



**Gravidade clínica muito variável**

**Modulada por factores modificadores hereditários**

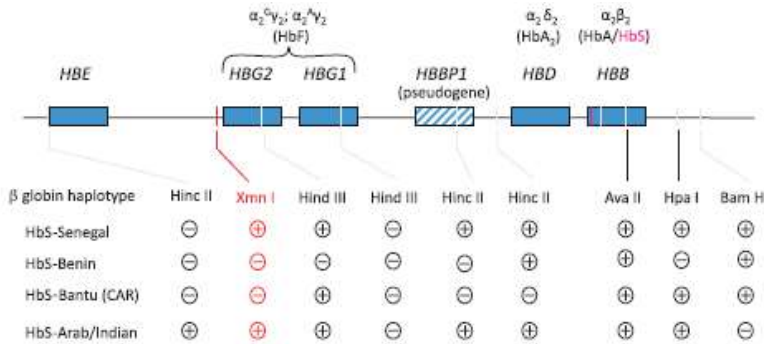
# Hemoglobinopatias

## Drepanocitose

### Factores moduladores da drepanocitose:

- α-talassémia:**
  - Redução do VGM, HGM e CHGM
  - Aumento do nível HbA<sub>2</sub>
  - Hemólise ↓, reticulócitos ↓, Ht ↑

- Haplótipo:**



Nível Hb total  
Nível de HbF

➔ Evolução clínica

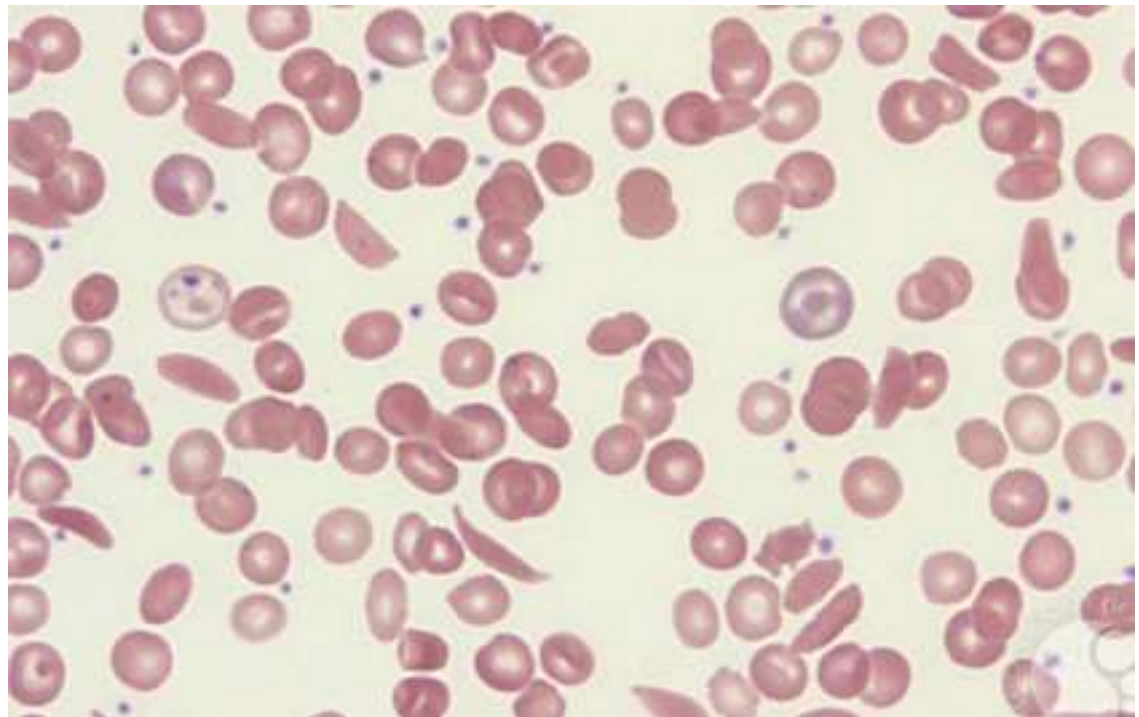
# Hemoglobinopatias

## Drepanocitose

### Diagnóstico Laboratorial

Sexo: M  
Idade: 9 anos

<b>GV</b>	<b>2,66</b>
<b>Hb</b>	<b>7,4</b>
<b>Ht</b>	<b>23,1</b>
<b>VGM</b>	<b>86,8</b>
<b>HGM</b>	<b>27,8</b>
<b>CHGM</b>	<b>32,0</b>
<b>RDW</b>	<b>24,5</b>



Esfregaço de sangue periférico de doente com drepanocitose (drepanócitos, células policromatófilas, células em alvo)

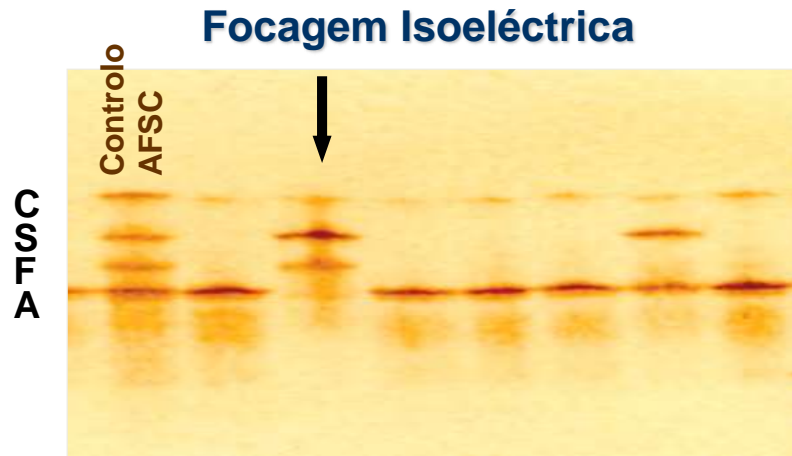
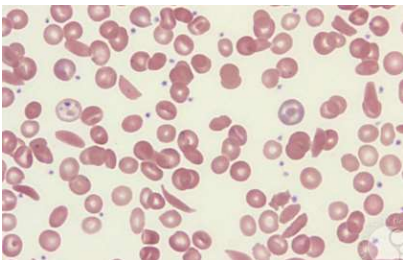
# Hemoglobinopatias

## Drepanocitose

### Diagnóstico Laboratorial

Sexo: M  
Idade: 9 anos

GV	2,66
Hb	7,4
Ht	23,1
VGM	86,8
HGM	27,8
CHGM	32,0
RDW	24,5



FIE: HbS, HbF, Hb A2 e ausência Hb A

**Teste de solubilidade:**

**Positivo**



**Quantificação da Hb S e Hb F**

Hb S	81,5%
Hb F	9,2%

# Hemoglobinopatias

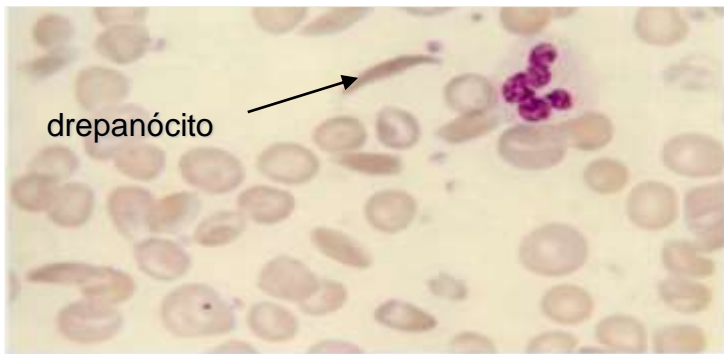
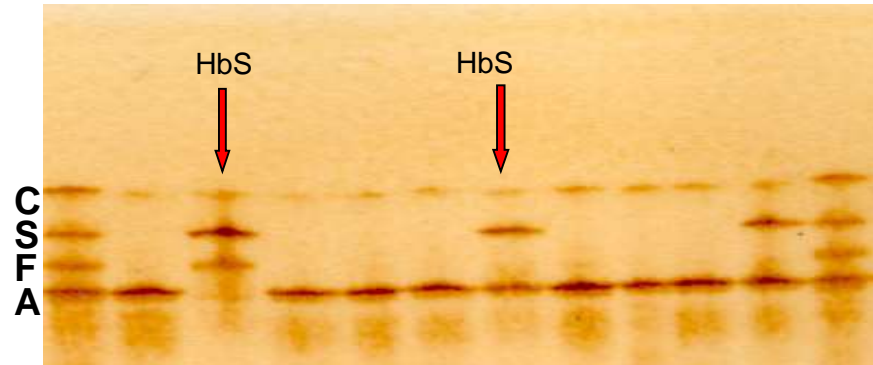
## Drepanocitose Diagnóstico Laboratorial

Teste de solubilidade:

Positivo



FIE - método qualitativo (pH 6-9)



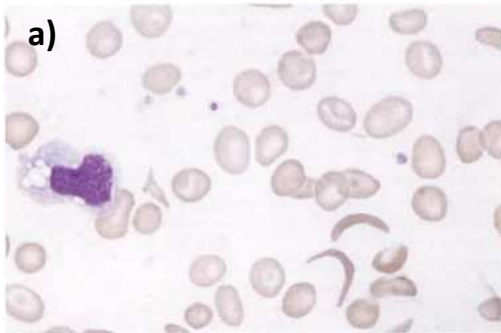
GV	2,66
Hb	7,4
Ht	23,1
VGM	86,8
HGM	27,8
CHGM	32,0
RDW	24,5

# Hemoglobinopatias

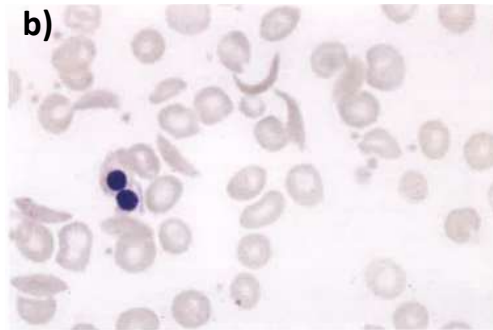
## Drepanocitose

### Diagnóstico Laboratorial

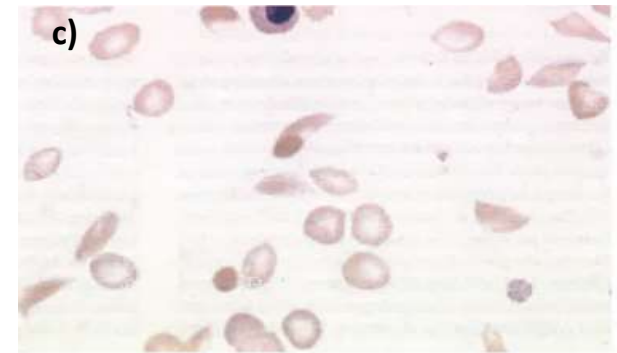
#### Esfregaço de sangue periférico



a) células falciformes e outros poiquilócitos



b) células falciformes, células parcialmente falciformes e glóbulos vermelhos nucleados



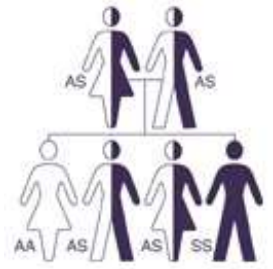
c) durante crise falciforme- células falciformes, células irregularmente contraídas, células "fantasma"

Barbara Bain, *Haemoglobinopathy Diagnosis* 2001 1ª ed. Blackwell Science

# Hemoglobinopatias

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

- Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias de casais em risco rastreios e confirmações em colaboração com laboratórios de saúde pública, e outras entidades de saúde, públicas e privadas laboratório diferenciado na área das hemoglobinopatias (acreditado ISO NP 15189-2014. Colaboração com laboratório de diagnóstico molecular e com o laboratório de investigação.**



- 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**

- Formação do pessoal de saúde e do público em geral estágios, atividades letivas, seminários, elaboração de folhetos de divulgação, colaboração com o PNAEQ**



## ❑ **Formação e ensino: colaboração com o PNAEQ**

PNAEQ

- **Ana Paula Faria**

Grupo de trabalho  
Hematologia

- **Armandina Miranda (INSA – DPSPDNT)**
- **Ana Reis (Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental- Patologia Clinica)**
- **Ana Miranda (Centro Hospitalar de Lisboa Norte, Patologia Clinica )**
- **Rui Barreira (Instituto de Oncologia de Lisboa , Patologia Clinica)**

# Hemoglobinopatias



Média do Nº de participantes: 21

---

Dados laboratoriais e clínicos enviados: idade, sexo, etnia /origem geográfica hemograma/eritrograma

✓ **Quantitativos** - avaliação de equipamentos/metodologias: Hb A<sub>2</sub> , Hb F, Hb S, Hb D, Hb C, Hb Lepore

Comparação com laboratórios peritos

CV%, % de corretos (ID)

✓ **Qualitativos**

Identificação da fração

Pesquisa Hb S- Teste solubilidade, teste falciformação

Comparação com laboratórios peritos e identificação de corretos

✓ **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

# Agradecimentos

---

## ❖ Equipa de trabalho hematologia/ hemoglobinopatias

Filomena Seuanes

Sandra Copeto

Gisela Gaspar

Alcina Costa



## ❖ Colegas do Departamento de Genética Humana

## ❖ Colegas do PNAEQ e Grupo de trabalho de Hematologia

# Obrigada

---



"To go fast, go alone. To go far, go together."

—African proverb

