TRAÇO FALCIFORME: ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICAS LABORATORIAIS UTILIZADAS PARA A TRIAGEM DA DOENÇA

SICKLE CELL TRAIT: A COMPARATIVE STUDY OF LABORATORY TECHNIQUES USED FOR SCREENING THE DISEASE.

Erika Janz WOITOWICZ¹; Railson HENNEBERG²; Paulo Henrique da SILVA²; Aguinaldo José do NASCIMENTO³

¹Aluna do curso de especialização em Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR
Avenida Lothário Meissner, 632, campus Botânico, Universidade Federal do Paraná
e-mail: erikajw@hotmail.com

² Docentes do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná – UFPR
e-mail: railson@ufpr.br
e-mail: paulo.hs@ufpr.br

³ Prof. Sênior do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR
e-mail: ajnasc@gmail.com

REC:04/210 AC:05/210

RESUMO:

O diagnóstico do traço falciforme é de suma importância para fins de saúde pública, pois possibilita aos agentes de saúde, estabelecer fundamentos de aconselhamento genético da população, diminuindo a incidência de novos casos do estado homozigoto da anemia falciforme. O teste de falcização e o teste de solubilidade são metodologias muito utilizadas como técnicas de diagnóstico para a doença falciforme. O presente estudo teve como objetivo comparar estes dois métodos, visando estabelecer critérios de avaliação para a sua utilização na rotina prática, através de um painel inter-observador. Nossos resultados demonstraram uma perfeita correlação entre as duas técnicas o que corrobora com estudos semelhantes anteriormente já realizados. Com os resultados obtidos nas análises, conclui-se que a escolha do emprego de uma ou outra técnica depende do tamanho da rotina de trabalho, da demanda de cada laboratório e da necessidade ou não de um resultado imediato. Assim, a avaliação destes fatores é que irá nortear a opção pela técnica adotada em cada local de trabalho, visto que ambos são muito úteis e eficazes no diagnóstico laboratorial da doença falciforme.

PALAVRAS-CHAVE: Doença falciforme, teste de solubilidade, teste de falcização.

ABSTRACT:

With the use of samples of blood donors previously diagnosed as carriers of sickle cell trait (AS) by testing the solubility tests were performed sickling to detect the presence of hemoglobin S. Sickling tests were examined by five observers in order to draw a profile of the comparative effectiveness of two techniques in order to counter the strengths and weaknesses and offer subsidies on the feasibility of such tests in laboratories

KEY-WORDS: Sickle cell disease, solubility test, sickling test.

1. INTRODUÇÃO

A escolha da metodologia laboratorial adequada para a identificação das hemoglobinas humanas anormais depende da suspeita clínica para a sua maior eficácia, sendo importante o conhecimento pelo laboratorista de suas reais aplicações e possíveis limitações. São ferramentas úteis de diagnóstico, além da avaliação dos índices hematimétricos; a eletroforese qualitativa de hemoglobina em acetato de celulose em pH alcalino; a dosagem de hemoglobina fetal; o teste de falcização; o teste de solubilidade para a hemoglobina S, entre outras técnicas úteis para o diagnóstico das modificações estruturais da hemoglobina (LIMA, 1984; NALBANDIAN, 1971).

A hemoglobina S (HbS) é uma hemoglobina variante, decorrente da mutação pontual na posição 6 do gene da cadeia globínica (glu $\rightarrow$ val), com conseqüente alteração nas propriedades físico-químicas da molécula. A troca de aminoácidos que resulta na HbS abala estruturalmente a molécula, pois se na Hemoglobina A(HbA), o ácido glutâmico da posição 6 da globina beta auxilia no afastamento das moléculas desoxigenadas de hemoglobinas. A entrada da valina nesta posição favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio. Quando desoxigenada, a HbS apresenta acentuada diminuição na solubilidade e agrega-se formando polímeros, alterando a morfologia do eritrócito para a forma “afoiçada” (ZAGO, 1999).

Os indivíduos heterozigotos (HbAS) são clinicamente e hematologicamente saudáveis; não apresentando em geral anemia e muito menos drepanócitos na extensão sanguínea. O crescimento e o desenvolvimento procedem normalmente, as infecções não ocorrem com maior frequência do que na população em geral e não se observa nenhum aumento na frequência de doenças dos ossos e das articulações (LEE et al, 1998; POWARS, 1989).

O traço falciforme é uma das formas clínicas da doença falciforme, sendo que sua confirmação diagnóstica depende da correta interpretação do hemograma, da eletroforese de hemoglobina, do teste de falcização e de provas de solubilidade para a hemoglobina anormal. As provas de solubilidade (precipitação da hemoglobina S em meio redutor) ou o teste de falcização (exame microscópico dos eritrócitos submetidos a desoxigenação) são imprescindíveis para a confirmação do caráter falciforme do componente hemoglobínico, visualizado na corrida eletroforética (CORRONS, 1994; LOUNDERBACK, 1974; PRUDENCIO, 2000).

A fenômeno da falcização pode ser induzido por agentes que provocam uma desoxigenação química, como o metabissulfito de sódio, sendo assim, quando uma solução de metabissulfito é adicionada ao sangue total, e esta mistura é lacrada entre lâmina e lamínula, os eritrócitos contendo HbS se deformam. Por outro lado, o teste de solubilidade, baseia-se no decréscimo da solubilidade da forma deoxi HbS. A hemoglobina S é insolúvel e precipita-se em solução, tornando turva a solução contendo ditionito de sódio (SCHNEIDER, 1967; SERJEANT, 1974; VERAS, 1998).

Diante do exposto, o presente estudo buscou avaliar duas metodologias propostas para a identificação da doença falciforme, através de um painel inter-observador, traçando um perfil comparativo das duas técnicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 112 amostras do serviço de Hemoterapia do Hemobanco de Curitiba no Estado do Paraná, previamente diagnosticadas como portadores do traço falciforme pelo teste da solubilidade. Todas estas amostras foram submetidas ao teste de falcização para comparação das metodologias. Para a pesquisa da HbS de cada doador, foram analisadas amostras de sangue total colhido EDTA K3 como anti-coagulante, utilizando-se o sistema de coleta a vácuo. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento da realização dos testes.

A metodologia do teste de solubilidade baseia-se na insolubilidade da HbS quando em estado reduzido. Em soluções de alta molaridade, a HbS é desoxigenada e forma polímeros insolúveis que impossibilitam sua absorção, sendo retido no papel filtro.

Para a realização desta técnica, foi preparado um tampão fosfato com 13,5g de KH_2PO_4 (anidro); 23,72g de K_2HPO_4 (anidro); 1,0g de saponina P.A. e 100 mL de H_2O . No momento da realização dos testes foi adicionado 0,1g de ditionito de sódio em 10 mL da solução tampão. Foram transferidos 200 μL da solução de trabalho em uma placa com fundo em U e, em seguida, foram adicionados 10 μL de sangue total.

Depois de passados cinco minutos, fez-se a dispensação de 10 μL do conteúdo de cada orifício em papel filtro e foi observada uma precipitação em forma de botão central com halos mais claros nos bordos nos testes positivos, enquanto nos testes negativos percebeu-se uma distribuição homogênea do sangue no papel filtro.

O teste de falcização foi realizado a partir da preparação de uma lâmina com 50 μL de sangue total e 100 μL de solução de metabissulfito de sódio a 2%. Após colocar a lamínula, suas margens foram seladas com esmalte e a lâmina foi colocada em uma placa de Petri úmida. Este teste foi submetido a um painel inter-observador. O teste de falcização foi realizado por cinco observadores, todos farmacêuticos e bioquímicos com no mínimo dois anos de experiência em hematologia, que atuam no setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Evangélico de Curitiba.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A HbS é uma das alterações hematológicas hereditárias de maior freqüência na população brasileira, com nítidas diferenças regionais. Devido a esta alta incidência, o uso de técnicas sensíveis e de execução prática se faz necessário na rotina dos laboratórios de análises clínicas para a detecção desta hemoglobinopatia (NAOUM, 1987). O traço das células falciformes raramente está associado a manifestações clínicas ou hematológicas de significado. Os indivíduos não têm anemia e a morfologia das hemácias é normal, na extensão sanguínea raramente são visualizados drepanócitos.

O diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias falciformes baseia-se principalmente na separação eletroforética, onde o traço das células falciformes é caracterizado por um padrão eletroforético contendo HbA e HbS. Para diferenciar a HbS de hemoglobinas não falciformes é necessário o uso de testes complementares como o teste de falcização ou o teste de solubilidade.

No presente trabalho, nós comparamos dois métodos de triagem para a melhor identificação do portador do traço falciforme (HbAS), visando estabelecer um melhor

protocolo dentro da rotina laboratorial para o diagnóstico desta freqüente alteração genética.

Todos os pacientes participantes do trabalho são doadores de sangue, portadores da associação da hemoglobina A e S (traço falciforme), do Serviço de Hemoterapia do Hemobanco de Curitiba, triados no referido Serviço através do teste de solubilidade. Estas amostras foram submetidas ao teste de falcização por cinco observadores do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Evangélico de Curitiba. Os resultados dos testes utilizados no trabalho estão descritos no anexo 1.

Em estudo comparativo dos resultados obtidos pelo uso de eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose, teste de solubilidade e teste de falcização, Hicks (1973) relatou as diferentes sensibilidades e especificidades de cada método citado. Os resultados indicaram uma sensibilidade de 97% com uma especificidade de 99,9% para o teste de falcização; 98,9% e 100% para o teste de solubilidade. A eletroforese apresentou sensibilidade e especificidade de 100% no referido estudo. Os autores também apresentam dados referentes ao percentual de falso positivos e falso negativos de cada técnica. Para o teste de falcização, teste de solubilidade e eletroforese, os percentuais de falso negativos foram 3%, 1% e 0% respectivamente. Já os percentuais de falso positivos foram 0,07% para o teste de falcização e 0% para os demais testes. Neste trabalho, ficou evidenciada a maior sensibilidade da eletroforese de hemoglobina sobre os outros dois testes.

O teste de solubilidade foi avaliada por Surve (2000) como teste de triagem para a doença falciforme. A sensibilidade da técnica encontrada foi de 93,8% e especificidade de 100%, com valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 96,7%, demonstrando ser um teste muito confiável para a detecção dos estados homozigotos e heterozigotos da doença falciforme.

Em nosso trabalho, após finalizadas as análises, verificou-se que tanto o teste de falcização quanto o teste de solubilidade obtiveram o mesmo número de positividade e eficiência. Nossos resultados, corroboram com outros estudos (SURVE, 2000; HICKS, 1973), que demonstram que nos aspectos de reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade, tanto o teste de falcização quanto o teste de solubilidade são muito semelhantes.

O teste de falcização, onde sob baixa tensão de oxigênio os eritrócitos contendo hemoglobina S tomam forma característica de foice, é um teste de custo muito baixo e com alta sensibilidade e especificidade, porém depende integralmente de uma prática cuidadosa para a confecção da lâmina a ser analisada e de experiência do observador para emitir o resultado. Outro ponto negativo desta técnica é o tempo levado para se obter um resultado, que, ao contrário do teste de solubilidade, não é imediato, sendo necessário o aguardo de no mínimo uma hora. O teste de solubilidade é um teste de fácil execução, rápido e que não necessita de treinamento nem experiência para a avaliação dos resultados. A tabela 1 oferece elementos explicativos sobre os testes analisados, confrontando os principais aspectos a serem considerados na prática laboratorial.

Apesar dos resultados idênticos, as duas técnicas apresentam diferentes aspectos de execução e interpretação, o que pode indicar o uso mais apropriado de uma em relação a outra. O teste de falcização necessita de uma certa experiência do observador, e visto que em nosso trabalho, todos os observadores tinham no mínimo

dois anos de experiência, estudos com enfoque diferente poderiam demonstrar resultados diferentes do nosso trabalho. Outro aspecto a ser evidenciado, é de que o resultado do teste de solubilidade é imediato e muito específico para a hemoglobina S, diferentemente do teste de falcização, que necessita, em alguns dos casos, de 24 horas para a sua definição, o que é um aspecto negativo para esta técnica.

TABELA 1.0 – Comparação entre as técnicas utilizadas no estudo.

	Teste de solubilidade	Teste de falcização
Experiência do analisador	Não é necessária	É necessária e imprescindível
Resultado	Imediato	Em até 24 horas
Execução da técnica	Fácil, não requer experiência. possibilidade de executar um grande número de testes de uma única vez.	Necessita de cautela e prática. é necessário que cada teste seja realizado de cada vez.

4. CONCLUSÃO

Ambos os testes são sensíveis, específicos e apresentam um baixo custo, mas a grande diferença entre eles está na execução da técnica, onde o teste de solubilidade se apresenta indiscutivelmente mais fácil e rápido. Com os resultados obtidos nas análises, conclui-se que a escolha do emprego de uma ou outra técnica depende do tamanho da rotina de trabalho, da demanda de cada laboratório e da necessidade ou não de um resultado imediato. Assim, a avaliação destes fatores é que irá nortear a opção pela técnica adotada em cada local de trabalho, visto que ambos são muito úteis e eficazes no diagnóstico laboratorial da doença falciforme.

REFERÊNCIAS

HICKS, E. J. ; GRIEP, J. A.; NORDSCHOW, C. D. **Comparison of Results for Three Methods of Hemoglobin S Identification.** Clin. Chem, 19/5, 1973. p. 533-535.

LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe Hematologia Clínica.** Vol. I. São Paulo: Manole, 1998.

LIMA, A. A.; ALBUQUERQUE, L. M.; LINS, M. S.; BEZERRA, T. M. **Hemoglobina S: estudo de uma família.** Rev. Bras. Anal. Clin., 1984; 16:1-3.

LOUNDERBACK, A. L.; YOUHNE, Y.; FONTANA, A.; NATLAND, M. **Clinical evaluation of rapid screening test for sickle cell trait (S) and sickle anemia (SS).** Clin. Chem., 1974; 20:761-764.

NALBANDIAN, R. M.; NICHOLS, B. M.; CAMP JR., F. R.; LUSHER, J. M.; CONTE, N.

F.; HENRY, R. L.; WOLF, P. L. **Automated Dithionite Test for Rapid, Inexpensive Detection of Hemoglobin S and Non-S Sickling Hemoglobinopathies.** Clin. Chem, vol. 17, n10, 1971; p.1033-1037.

POWARS, D. **Diagnosis at birth improves survival of children with sickle cell anemia.** Pediatrics, 1989; 83:830-833.

PRUDÊNCIO, B. C. A. B., COVAS, D. J.; DOMINGOS, C. R. .B. **Comparação de metodologia utilizada para a detecção de hemoglobina S (HbS) em doadores de sangue.** Rev. Bras. Hematol. Hemoter., 2000, 22 (2):99-109.

SCHNEIDER,R.G; ALPERIN,J.B.LEHMANN,H. Sickling tests. Pitfalls in performance and interpretation. **JAMA**, 1967; 202(5);419-421.

SERJEANT; B. E.; FORBES, M.; WILLIAMS, L.L.; SERJEANT, G.R. **Screening cord bloods for detection of sickle cell disease in Jamaica.** Clin. Chem., 1974; 20:666-669.

SURVE, R. R; MUKHERJEE, M. B.; KATE, S. L.; NAGTILAK, S. B.; WADIA, M.; TAMANKAR, A. A.; GHOSH, K.; COLAH, R. B.; MOHANTY, D. **Detection of the beta s gene: an evaluation of the solubility test against automated chromatography and hemoglobin electrophoresis.** Br J Biome Sci 2000; 57:292-294.

VERAS, M. S.; COELHO, S. B. V.; SOUSA, J.; CARDOSO, L; SANTOS, JF. **Prevalência do traço falciforme em doadores de sangue do Distrito Federal.** Ver. Saúde Dist. Fed., 1998, 9 (1): 9-12.

ZAGO, M. A; SILVAJR, W. A.; FRANCO, R. F. **Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population.** Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, 1999, 51(3/4):226-234.