

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS TESTES DE SOLUBILIDADE, FALCIZAÇÃO E GEL-CENTRIFUGAÇÃO PARA DETECÇÃO POPULACIONAL DA HEMOGLOBINA S.

Marilena OSHIRO*
Adelino POLI NETO*
Karen MIGUITA**
Cecília Ioshie WATANABE**
Delma Lúcia Biancardi PALHARINI**

RIALA 06/865

OSHIRO, M.; POLI NETO, A.; MIGUITA, K.; WATANABE, C.I.; PALHARINI, D.L.B. – Estudo comparativo entre os testes de solubilidade, falcização e gel-centrifugação para detecção populacional da hemoglobina S. Rev.Inst. Adolfo Lutz,58(2): 53-56, 1999.

RESUMO: A Hemoglobinopatia S é considerada doença de saúde pública devido à sua morbidade e frequência. É o desenvolvimento de “screenings” é útil. Em 836 amostras de sangue periférico de gestantes foram realizados, o teste de solubilidade, o teste de falcização e o novo teste em gel-centrifugação (ID-Sickle Cell Test-DIAMED). 28 amostras foram igualmente positivas para Hb S nos três métodos utilizados sem discrepâncias, onde todos apresentaram a mesma especificidade e sensibilidade na detecção dessa hemoglobina. Entretanto, o teste da gel-centrifugação e o teste de solubilidade demonstraram rapidez na obtenção dos resultados e a possibilidade de serem executados com pouco treinamento.

DESCRITORES: Solubilidade, Falcização, Gel-centrifugação, Hemoglobina S.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina S se diferencia das hemoglobinas normais por apresentar em sua estrutura a substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia polipeptídica beta β_6 Glu \rightarrow Val). Esta substituição faz com que em baixas tensões de oxigênio, a Hb S torne insolúvel e polimerize formando tactóides, levando a célula à forma de foice. Esses polímeros provocam rigidez e distorção dos eritrócitos, fazendo com que os mesmos sejam retirados da circulação pelas células retículo-endoteliais, diminuindo assim a sua vida média e, conseqüentemente o aparecimento de anemia hemolítica.^{1,16}

Emmel⁵ em 1917 descreveu a prova de falcização, modificada posteriormente por Daland e Castle⁴ em 1948, em que as hemácias que contém a hemoglobina S adquirem a forma de foice em baixas tensões de oxigênio. E, baseado no fato da hemoglobina S ser insolúvel em altas concentrações de tampão fosfato, Itano⁹ em 1953 desenvolveu o Teste de Solubilidade para HbS. Outras técnicas tem sido utilizadas na detecção de hemoglobinopatias, como HPLC (High Performance Liquid Chromatography)^{11,15}; LPLC (Low Pressure Liquid Chromatography System)² e IEF (Isoelectric Focusing)¹². Vários outros testes são comercializados em forma de kit¹, entre elas o teste em gel-centrifugação, baseado no fenômeno da falcização “in vitro”.

* Seção de Hematologia, Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

** Bolsista PAP/SES/FUNDAP, Seção de Hematologia, Instituto Adolfo Lutz.

O objetivo desse trabalho foi comparar o teste de solubilidade, o teste de falcização e o teste de gel-centrifugação na detecção de hemoglobina S.

CASUÍSTICA E MÉTODOS:

Foram estudados, 836 amostras de pacientes de pré-natal, advindas de Centro de Saúde da cidade de São Paulo. O sangue foi coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA e analisados dentro de no máximo 3 dias, conservados a 4°C.

Cada um dos testes abaixo descritos foram realizados por pessoas diferentes e foram utilizados controles positivos e negativos para HbS.

1. Teste de solubilidade¹³:

Princípio: O teste se baseia na insolubilidade da HbS no estado reduzido enquanto que outras hemoglobinas são insolúveis. É um teste que detecta apenas a HbS.

Interpretação: O teste é positivo quando a visualização das linhas negras traçadas no papel não são vista, devido a turvação da solução indicando a presença de HbS. O teste é negativo quando a visualização dos traços são bem visíveis. (Figura 1)

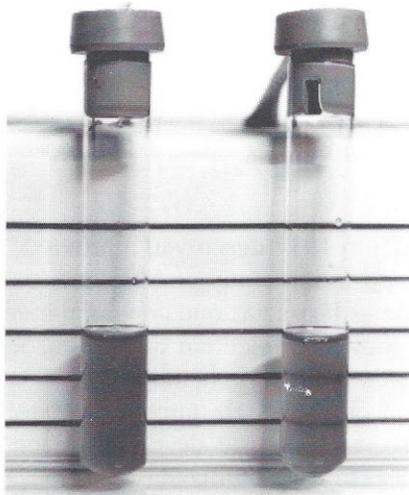


Figura 1 — Teste de Solubilidade para HbS

2. Teste de falcização¹³:

Princípio: O metabisulfito de sódio reduz a tensão de oxigênio e quando adicionada ao sangue total em um compartimento totalmente vedado, as hemácias contendo HbS tendem à deformação celular característica de foice ou de meia-lua.

Interpretação: O teste é positivo quando há presença de hemácias em forma de foice ou de meia-lua. É negativo quando há ausência dessas deformações após 24 horas. (Figura 2)

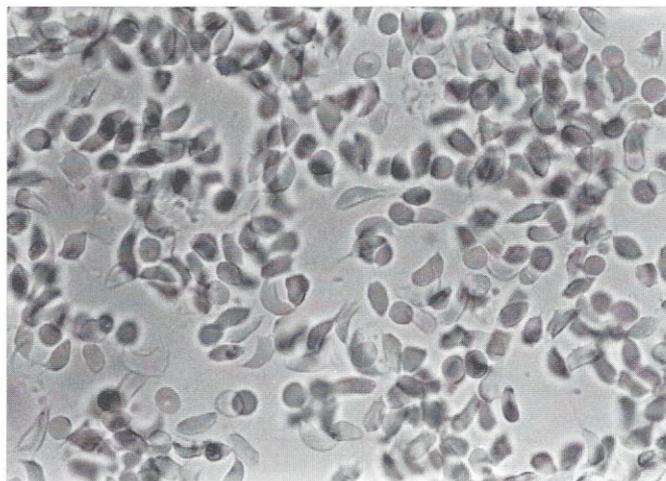


Figura 2 — Teste de falcização.

3. Teste de gel-centrifugação ID-Sickle Cell Test (HbS).

Princípio: A solução tamponada contendo agente redutor, quando em contato com hemácias contendo HbS, estas células tornam-se rígidas impedindo a sua passagem pelo gel Sephadex, suspenso em microtubo, após centrifugação.

Interpretação: O teste é positivo quando, as células falcizadas são retidas no topo do micro-tubo ou espalhadas pelo gel. É negativo quando todas as células deslocam-se para o fundo do micro-tubo. (Fig.3.1 e 3.2)



Figura 3.1 — Teste em gel-centrifugação

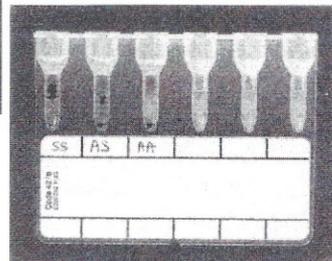


Figura 3.2 — Teste em gel-centrifugação

RESULTADO:

Das 836 amostras, 28 amostras com hemoglobina S foram detectadas igualmente pelos três métodos utilizados, sem discrepâncias. Todos apresentaram a mesma especificidade e sensibilidade na detecção dessa hemoglobina que revelaram a prevalência de 3,5%, dado semelhante ao encontrado em nosso laboratório em 1995 por Gushiken e col.⁷

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

Diversos estudos populacionais de hemoglobinas anormais tem sido realizados em diversas regiões brasileira e tem sido encontradas prevalências variáveis que variam de 2 a 11% de acordo com o grau de miscigenação étnica, com predominância das variantes S e C, ambas consideradas de maior relevância em termos de Saúde Pública, devido a sua morbidade e frequência.⁷ Assim, a detecção precoce da HbS é importante para indicar medidas terapêuticas na prevenção de complicações da doença e no aconselhamento genético com o intuito de informar aos portadores, da possibilidade de transmissão aos seus descendentes.

O teste de solubilidade apresentou-se como método rápido (aproximadamente 10 min.) e de fácil identificação. Porém, alguns autores relataram resultados falso positivos em indivíduos com hemoglobina instável, com baixa concentração de Hb, com hiperproteinemia e resultado falso negativo em indivíduos AS que também é alfa-talassêmico.^{3,6,10} Naoun¹⁴ relata algumas precauções em relação à essa técnica, como por exemplo o uso de sais anidro e a necessidade de dobrar o volume da amostra em caso de hematócrito abaixo de 20%.

O teste de falcização apresentou-se como teste sensível para HbS provando ser um teste confiável,

desde que bem realizado e analisado por técnico treinado na observação de células falcizadas. A importância da concentração do reagente utilizado, o metabissulfito e o seu preparo momentos antes do uso, a vedação, tempo de reação, presença quantitativa de HbS e de Hb F são fatores que podem interferir na sensibilidade do método, segundo Naoun¹³. Mas, ele não é específico, porque o teste pode ter reação positiva para outras hemoglobinas que apresentam comportamento semelhante às HbS, como: HbC(Halem), e possivelmente HbAlexandra, HbC-Zigüinchor e HbS-Travis. Bunn e Forget¹ relatam que indivíduos heterozigotos (AS) com grave deficiência de ferro, a técnica pode falhar devido a diminuição da concentração intracelular de hemoglobina.

O teste do gel para HbS é um método que tem o mesmo princípio do teste de falcização. Observou-se que é um método rápido, específico e sensível. Entretanto, requereu alguns cuidados quanto à liofilização do reagente redutor, que exigiu água bidestilada e agitação gentil por inversão e na estabilidade por apenas duas horas após o preparo.

Todos os métodos utilizados apresentaram especificidade e sensibilidade na detecção de HbS. O teste em gel-centrifugação e o teste de solubilidade são mais práticas em relação ao teste de falcização, quanto à execução da técnica, a rapidez no resultado e do treinamento rápido e fácil do técnico. Todos são métodos de avaliações qualitativas e portando, quando positiva há necessidade da confirmação e as possíveis interações com outras hemoglobinas anômalas, que pode ser realizada através de eletroforese em tampão alcalino e ácido.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Prof^o Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto da FMUSP pela orientação deste trabalho.

RIALA 06/865

OSHIRO, M.; POLI NETO, A.; MIGUITA, K.; WATANABE, C.I.; PALHARINI, D.L.B. — Comparative study among the test solubility, the sickling and the gel-centrifugation for detection of the hemoglobin S.

ABSTRACT: The hemoglobin S has been considered a public health disease due to its high frequency and morbidity. The development of screening methods is important to assist the clinic diagnosis and to help elaborate therapy measures. The peripheral blood of 836 samples were analyzed by the solubility test, the sickling test and the gel-centrifugation test. Twenty-eight samples were positive for hemoglobin S in the three tests analysed, disclosing the same sensibility and specificity for all of them. However, the solubility test and the gel-centrifugation method were faster than the sickling test, besides requiring short technician training period.

KEY WORDS: Solubility, Sickling, Gel-centrifugation, Hemoglobin S.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. BUNN, H.F. & FORGET, B.G. — *Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspect*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1986. cap.11-12.
2. CHAMBERS, K.; PHILLIPS, A. & CHAMPMAN, C.S. — Use of a low pressure liquid chromatography system for haemoglobinopathy screening. *Clin Lab Haematology*, 15(2): 119-28, 1993.
3. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. — *Practical Haematology* 8^o ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1995, p.609.
4. DALAND, G.A. & CASTLE, W.B. — A simple method for demonstration sickling of red blood cells, the use of reducing agents. *J.Lab.Clin.Med.*, 33:1882, 1948.
5. EMMEL, V.E. — A study of the erythrocytes in a cases of severe anemia with elongated sickle shaped red blood corpuscles. *Arch. Intern. Med.*, 20:586,1917.
6. FAIRBANKS, V.F. & PETTIT, R.M. — Sickledex test in unstable hemoglobin disorders. *J.A. M. A.*, 220:128, 1972
7. GUSHIKEN, E.Y.; KITAMURA, C.; MIYAMARU-YOKOMIZO,R.; ZAMFIROV,V.M.C.; ARRUDA, I.C.; MUNHOZ, M.A.G.; CANGERANA-PEREIRA,F.A. & MARTINS, H.P. — Frequência de hemoglobinopatia S detectada no Instituto Adolfo Lutz-Central e sua importância em saúde pública. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 27(4):130-132, 1995.
8. HUISMAN, TH The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Clin Haematol.*, 6(1): 1-30, 1993.
9. ITANO, H.A. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobins. *Arch. Biochem. Biophys*,47:148, 1953.
10. KNAUS, J.S. & HAHN, D.A. — Homozygous alfa thalassemia causing a false negative solubility test in sickle cell trait. *Clin.Chem.* 27:1146, 1981.
11. LOREY, F.; CUNNINGHAM, G.; SHAFER, F.; LUBIN, B.& VICHINSKY, E.- Universal screening for hemoglobinopathies using high-performance liquid chromatography: clinical results of 2.2 milion screens. *Eur. J.Hum.Genet.*, 2(4):262-71, 1994.
12. MONTENI, S.; FRISCHKNECHT, H.& THORMANN, W. Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants. *Electrophoresis*, 15(1):22-30, 1994.
13. NAOUM, P.C. — *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo : Editora Sarvier, 1997. p. 171.
14. NAOUM, P.C. — *Eletroforese –Técnicas e Diagnósticos*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1990. p. 173 : cap.4.
15. VAN DER DIJS, F.P.; VAN DEN BERG, G.A. ; SCHERMER, J.G.; MUSKIET, F.D.; LANDMAN, H. & MUSKIET, F.A. — Screening cord blood for hemoglobinopathies and thalassemia by HPLC. *Clin.Chem.*, 38(9):1864-9, 1992.
16. VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F. & WENDEL NETO, S. — *Hematologia e Hemoterapia* — Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. In: VERRASTRO, Therezinha. Principais tipos clínicos de anemia. São Paulo: Atheneu, 1996. 303 p. p. 68-69.

Recebido para publicação em 04/12/1998