

Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal

S Hemoglobin diagnosis: comparative analysis of the solubility test with the electrophoresis in alkaline and acid pH during the neonatal period

Flavia Miranda Gomes de Constantino Bandeira ¹
 Mariana de Carvalho Leal ²
 Rafael Rocha Souza ³
 Veridiana Câmara Furtado ⁴
 Yara de Miranda Gomes ⁵

¹⁻³ Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). Rua Joaquim Nabuco, 171. Recife, PE, Brasil. CEP: 52.011-000.

^{4,5} Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Fundação Oswaldo Cruz. Recife, PE.

Abstract

Objectives: to evaluate the efficacy of the solubility test as a screening method for hemoglobin S detection in newborns compared to alkaline and acid hemoglobin electrophoresis.

Methods: a total of 1.988 cord blood samples from newborns at Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) during the period of October 1996 to March 1997 were submitted to alkaline hemoglobin electrophoresis and solubility test. Following this, acid hemoglobin electrophoresis was performed as a confirmatory test, when Hb S was present in the first two tests mentioned.

Results: Hb S was detected in 105 (5,3%) of the 1.988 samples by alkaline electrophoresis and were confirmed by acid electrophoresis in 98 (93,3%). Solubility test has detected Hb S in only one sample.

Conclusions: alkaline hemoglobin electrophoresis has been effective for Hb S screening in newborn period and can be used in places where more sophisticated techniques are not available. Solubility test must not be used as a screening method in this period of life.

Key words Hemoglobin, sickle, Neonatal screening, Hemoglobinopathies, Diagnosis

Resumo

Objetivos: avaliar a eficácia do teste de solubilidade como método de triagem na detecção de Hb S no período neonatal, comparando-o com as técnicas de eletroforese em pH alcalino e ácido.

Métodos: o sangue de cordão umbilical de 1.988 recém-nascidos (RN) na maternidade do Instituto Materno-Infantil de Pernambuco (IMIP), durante o período outubro de 1996 a março de 1997, foi submetido à eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e ao teste de solubilidade. A eletroforese de hemoglobina em pH ácido foi realizada como teste confirmatório em todos os casos em que a eletroforese em pH alcalino foi positiva para Hb S ou Hb C.

Resultados: a eletroforese de Hb em pH alcalino detectou a presença de Hb S em 105 (5,3%) amostras. A análise dessas 105 amostras através da eletroforese em pH ácido mostrou que 98 (93,3%) mantiveram o mesmo padrão eletroforético. O teste de solubilidade detectou apenas um RN portador de Hb S.

Conclusões: a eletroforese de Hb em pH alcalino mostrou-se eficaz no diagnóstico da hemoglobina S no período neonatal, podendo ser utilizada nos locais onde técnicas mais sofisticadas não estão implantadas. O teste de solubilidade não serve como abordagem diagnóstica para a presença de Hb S no período neonatal.

Palavras-chave Hemoglobina falciforme, Triagem neonatal, Hemoglobinopatias, Diagnóstico

Introdução

O diagnóstico de hemoglobinopatia S no período neonatal é dificultado pela presença de grande quantidade de hemoglobina fetal (Hb F) quando utilizada a eletroforese em pH alcalino. O emprego de eletroforese em pH ácido visa a reduzir esse problema, pois melhora a condição de separação das frações de hemoglobina, além de separar a fração S da D, e a C da E, que correm na mesma faixa na eletroforese em pH alcalino.^{1,2}

A detecção da Hb S, quando realizada através da eletroforese em acetato de celulose, deve ser associada a métodos de comprovação, como teste de falcização, prova de solubilidade e eletroforese em pH ácido. A hemoglobina é uma proteína carregada negativamente e a eletroforese de Hb em pH alcalino (8,4 - 8,6) parte desse princípio, uma vez que durante a corrida eletroforética essas proteínas migram para o pólo positivo. As hemoglobinas com defeitos estruturais causados por substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoelétricos vão apresentar mudanças em suas cargas elétricas, resultando na ocorrência de diferentes mobilidades.^{1,3}

Devido à grande quantidade de Hb F (efeito diluidor) no período neonatal, testes como o de falcização (metabisulfito de sódio) e de solubilidade (ditionito de sódio) freqüentemente resultam em falsos negativos.⁴ Esse último apresenta uma boa sensibilidade para a triagem de Hb S em outras faixas etárias, e segundo Louderback *et al.*⁵ e Surve *et al.*⁶ chega a uma acurácia de 99,8% na identificação desta Hb. Ainda oferece custo bem mais baixo do que a eletroforese e é de fácil execução. O teste de solubilidade baseia-se no fato de que, sob baixas concentrações de oxigênio, a Hb S torna-se 100 vezes menos solúvel que sua forma oxigenada.³

No entanto, o teste de solubilidade não apresenta boa sensibilidade para detecção da presença de Hb S no período neonatal, especialmente nos RN prematuros, uma vez que neste período ainda não houve a transição de Hb F para hemoglobina do adulto. Nessa faixa etária até mais ou menos os seis meses de idade, um teste de solubilidade negativo deve ser interpretado com cautela, principalmente se feito por ocasião de uma situação de emergência.⁷

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do teste de solubilidade como método de triagem na detecção de Hb S no período neonatal comparando-o com as técnicas de eletroforese em pH alcalino e ácido.

Métodos

As amostras testadas foram obtidas na maternidade do Instituto Materno-Infantil de Pernambuco (IMIP), Recife, Brasil, durante o período outubro de 1996 a março de 1997. O protocolo utilizado no presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética do IMIP.

O sangue de cordão umbilical de 1.988 recém-nascidos (RN), na quantidade mínima de 1ml e máxima de 5ml, foi coletado e colocado em um tubo contendo EDTA a 5%. As amostras foram armazenadas a 4°C por um período máximo de sete dias, quando foram submetidas a eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e ao teste de solubilidade. A eletroforese de hemoglobina em pH ácido foi também realizada como teste confirmatório em todos os casos em que a eletroforese em pH alcalino foi positiva para Hb S ou Hb C.

Para o teste de solubilidade, 200µl de sangue foram colocados em cada poço de uma placa de microtitulação, adicionando-se em seguida 50ml da solução hemolisante constituída de 10mg de Na₂S₂O₄ para cada ml da solução fosfato (K₂HPO₄ - 29,66g; KH₂PO₄ - 16,89g; saponina - 1,25g; 125ml de água destilada). Após homogeneização, 20ml foram removidos e aplicados em papel filtro Whatman n° 6.³ A leitura do teste foi feita a olho nu, um a dois minutos após a aplicação do hemolisado no papel de filtro, sendo que no caso positivo observou-se o centro escuro com um halo mais claro.

A eletroforese em pH alcalino foi realizada utilizando-se os seguintes materiais procedentes do HELENA Laboratories: Titan III (76 x 60mm - Hemoglobina) -Cód. 3022; Tampão Supre-Heme - Cód. 5802; Titan Gel Chamber - Cód. 4063; Super Z 8 - Kit aplicador - Cód. 4088; Ponceau S - Cód. 5526; Clair Aid - solução transparentizadora acetato de celulose - Cód. 5005. O sangue do cordão umbilical foi hemolisado com saponina a 1% na proporção de 1:3, respectivamente. Como controle, amostra de sangue AS (Hb AS) foi utilizada. Após 10 minutos o hemolisado foi depositado na membrana de acetato de celulose. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, com uma voltagem de 280 V por 20 minutos. As proteínas foram coradas com Ponceau S.³ A leitura do teste foi feita a olho nu imediatamente após a coloração da placa, onde foram observadas as bandas protéicas e comparadas com o controle, aplicado em todas as corridas eletroforéticas.

A eletroforese em pH ácido foi realizada segundo Naoum.³ O hemolisado obtido após tratamento das hemácias com a solução hemolisante (saponina - 1g; KCN - 10mg; H₂O - 100ml), na proporção de

2:1, respectivamente, foi aplicado sobre uma lâmina contendo ágar-gel (Bacto-agar-Difco) a 1% em tampão fosfato 6,2. A eletroforese foi processada com uma voltagem constante de 150V durante 15 minutos e as proteínas coradas com amido black a 1% em ácido acético a 10%. A leitura do teste, também a olho nu, foi feita após remoção do excesso do corante, sendo observadas as bandas protéicas também comparadas com um controle AS.

Resultados

A Figura 1 mostra o perfil eletroforético representativo de Hb em pH alcalino das 1.988 amostras analisadas. Destas, 105 (5,3%) apresentavam presença de Hb S. Dos 105 RN que apresentaram presença de Hb S na eletroforese em pH alcalino, 98 (93,3%) mantiveram o mesmo padrão eletroforético após o teste confirmatório com pH ácido (Figura 2). As sete (6,7%) amostras restantes não foram confirmadas Hb S positivas, sendo os resultados considerados falso-positivos no processo de triagem.

Figura 1

Eletroforese de hemoglobina (Hb) em pH alcalino realizada em sangue de cordão umbilical. Amostra representativa dos recém-nascidos no Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) examinados entre outubro de 1996 a março de 1997. 1: controle AS; 2, 3, 4, 5, 6 e 8: FA; 7: FAS. AS = Hb A e HbS; FA = Hb F e Hb A; FAS = HbF, HbA e HbS.

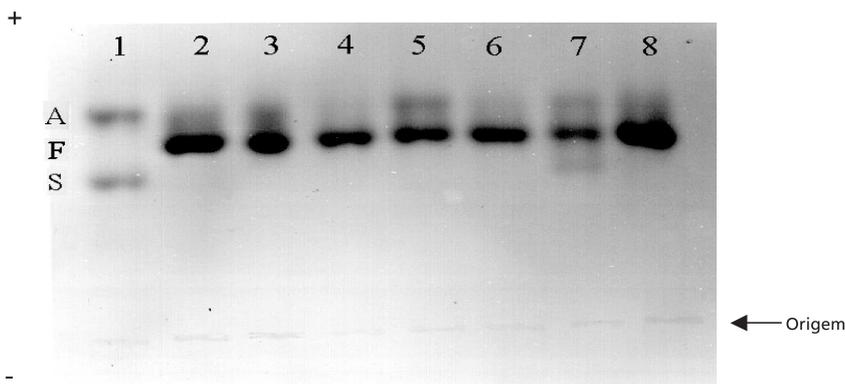
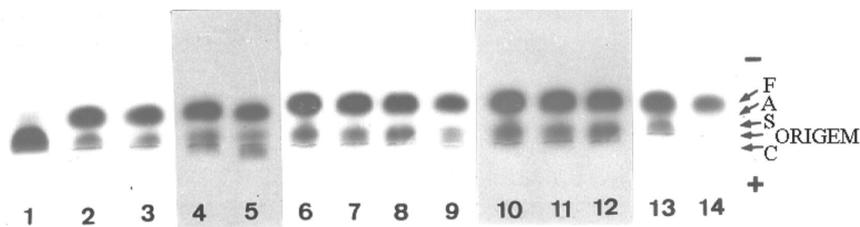


Figura 2

Eletroforese de hemoglobina (Hb) em pH ácido realizada em sangue de cordão umbilical. Amostra representativa dos recém-nascidos no Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) entre outubro de 1996 a março de 1997. 1: controle AS; 5: SC; 14: FA; 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13: FAS. AS = HbA e HbS, SC = HbS e HbC, FA = Hb F e Hb A, FAS = HbF, HbA e HbS.



bina fetal e estudos familiares.

No Brasil, Ruiz *et al.*¹⁰ analisaram em Santos, SP, 2.281 amostras de sangue de cordão umbilical do ponto de vista eletroforético e comentam as vantagens da eletroforese de Hb em pH alcalino seguida pela eletroforese em pH ácido em nosso meio, uma vez que métodos mais sofisticados podem significar aumento de custo, além de trazer implicações do ponto de vista ético. Isto porque, caso seja feito diagnóstico ante-natal através de análise de DNA, não há em nosso país legislação que adote a interrupção da gestação como solução.

Estudando os RN no IMIP, a eletroforese de Hb em pH alcalino, seguida de eletroforese em pH ácido (nos casos positivos na triagem), mostrou-se adequada ao objetivo proposto, uma vez que após realização do teste confirmatório, 98 (93,3%) dos 105 RN positivos mantiveram o padrão eletroforético encontrado na triagem. Os sete RN restantes não foram confirmados como positivos, tendo sido portanto considerados como falso-positivos durante a triagem. Por outro lado, o teste de solubilidade detectou apenas um RN portador de Hb S, não de-

tectando as demais amostras positivas, assim como não apresentou resultado falso-positivo. O teste de solubilidade, apesar de ser uma técnica de baixo custo, fácil execução e sensível quando usada em maiores de 12 meses de idade.^{3,13} não se mostrou útil para a triagem de Hb S em sangue de cordão umbilical, que é rico em Hb fetal, como previamente demonstrado por Louderback *et al.*⁵ e Capps-Jenner.⁷

De acordo com Powars¹⁴ o método de seleção para o diagnóstico de hemoglobinopatias no RN deve ser baseado na experiência do local onde vai ser realizado, no custo implicado e na aceitação familiar dos procedimentos oferecidos.

Técnicas como eletroforese através de focalização isoeletrica, HPLC, análise de DNA em material obtido através de punção de vilosidade coriônica, entre outras, têm sido usadas também em estudos populacionais em locais onde esses exames são disponíveis. No entanto não colocam os métodos empregados neste trabalho fora de uso, já que inúmeros autores apresentam resultados adequados usando estes dois métodos.^{4,9,15-18}

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e à Helena Laboratories pelo apoio financeiro.

Referências

1. Naoum PC, editor. Eletroforese: técnicas e diagnósticos. São Paulo: Santos; 1990, p. 91.
2. Naoum PC, editor. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: Sarvier; 1997, p. 144-171.
3. Naoum PC, editor. Diagnóstico das hemoglobinopatias. São Paulo: Sarvier; 1987, 161-192.
4. Pearson HA. A neonatal programme for sickle cell anemia. *Adv Pediatr* 1986; 33: 381-400.
5. Louderback AL, Youhne Y, Fontana A, Natland M. Clinical evaluation of a rapid screening test for sickle cell trait (S) and sickle cell anemia (SS). *Clin Chem* 1974; 20: 761-4.
6. Surve RR, Mukherjee MB, Kate SL, Nagtilak SB, Wadia M, Tamankar AA, Ghosh K, Colah RB, Mohanty D. Detection of the beta s gene: na evaluation of the solubility test against automated chromatography and hemoglobin electrophoresis. *Br J Biome Sci* 2000;57:292-94.
7. Capps-Jenner AE, coordinator. Investigation of the micro-method for Hb "S" detection as used in Brazil. London: Whittington Hospital; 1994.
8. Serjeant BE, Forbes M, Williams LL, Serjeant GR Screening cord bloods for detection of sickle cell disease in Jamaica. *Clin Chem* 1974; 20: 666-9.

9. Kramer MS, Rooks Y, Jonhston D, Pearson H. Accuracy of cord blood screening for sickle hemoglobinopathies - three to five years follow up. *JAMA* 1979; 241: 485-6.
10. Ruiz MA, Guerra CC, Naoum PC. Detecção de hemoglobinas anormais em sangue de cordão de recém-nascidos na cidade de Santos, SP, através de eletroforese em gel de ágar amido. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter* 1986; 8: 8-13.
11. Old JM. Screening and genetic diagnosis of hemoglobin disorders. *Blood Reviews* 2003; 17: 43-63.
12. American Academy of Pediatrics. Committee on Genetics. Newborn screening fact sheets. *Pediatrics* 1996; 98: 473-501.
13. Lima AA, Albuquerque LM, Lins MS, Bezerra TM. Hemoglobina S: estudo de uma família. *Rev Bras Anal Clin* 1984; 16: 1-3.
14. Powars D. Diagnosis at birth improves survival of children with sickle cell anemia. *Pediatrics* 1989; 83: 830-33.
15. Headings VE. Sickle cell disease in childhood-strategies for early diagnosis. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1982; 4: 67-71.
16. Ibarra GH, Zayas MA, Suardiaz B, Balea AD, Ruiz MM. Eficiência del programa de prevencion de la anemia por hematies falciformes (AHF) en ciudad de la Habana, en el periodo de enero a diciembre de 1986. *Rev Cuba Pediatr* 1989; 61: 107-12.
17. Naoum PC, Domingos CRB. Atualização de técnicas para hemoglobinopatias. São José do Rio Preto: Universidade do Estado de São Paulo; 1995.
18. Bandeira FMG, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes YM, Marques NM. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina "S" detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. *J Pediatr [Rio de Janeiro]* 1999; 75: 167-71.

Recebido em 14 de maio de 2003

Versão final rerepresentada em 8 de agosto de 2003

Aprovado em 26 de agosto de 2003