



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**CONTROLO DE QUALIDADE EM LABORATÓRIO CLÍNICO:  
HEMOGLOBINOPATIAS**

Trabalho submetido por

**Filipa da Costa Vilhena**

para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

**junho de 2015**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**CONTROLO DE QUALIDADE EM LABORATÓRIO CLÍNICO:  
HEMOGLOBINOPATIAS**

Trabalho submetido por

**Filipa da Costa Vilhena**

para a obtenção do grau de **Mestre** em Análises Clínicas

Trabalho orientado por

**Prof. Doutora Manuela Caniça**

e coorientado por

**Dra. Ana Paula Faria e Dra. Armandina Miranda**

**junho de 2015**



## Índice

Resumo .....	11
1 Introdução.....	13
1.1 Enquadramento .....	13
1.2 Objetivos .....	14
1.3 Caracterização da Organização.....	14
1.3.1 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge .....	14
1.3.2 Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência (UDR).....	15
1.3.3 Unidade do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ).....	15
1.4 Caraterização do Laboratório Clínico.....	18
1.4.1 Laboratório Clínico e termos laboratoriais .....	18
1.4.2 Fases do processo laboratorial.....	20
1.5 Controlo de Qualidade no Laboratório Clínico .....	21
1.5.1 Qualidade no laboratório clínico .....	21
1.5.2 Controlo da Qualidade Interno .....	23
1.5.3 Avaliação Externa da Qualidade .....	27
1.5.4 Erro total analítico .....	34
1.6 Hemoglobinopatias .....	35
1.6.1 Estrutura e funções da hemoglobina.....	35
1.6.2 Síntese da hemoglobina durante o desenvolvimento.....	36
1.6.3 Classificação das hemoglobinopatias .....	37
1.6.4 Dados epidemiológicos das hemoglobinopatias.....	43
1.6.5 Métodos de diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias .....	46
2 Material e Métodos.....	51
2.1 Ensaio de controlo de qualidade interno e de avaliação externa em Hemoglobinopatias – UDR/DPS: 2011 – 2014 .....	51
2.2 Ensaio de AEQ enviados pelo PNAEQ no âmbito das hemoglobinopatias: 2011-2014 .....	52
3 Resultados e Discussão .....	54
3.1 Controlo de Qualidade Interno em Hemoglobinopatias .....	54
3.1.1 Avaliação da quantificação da Hb A <sub>2</sub> .....	54
3.1.2 Avaliação da quantificação da Hb F.....	61
3.1.3 Avaliação da quantificação da Hb S.....	67

3.2	Avaliação Externa da Qualidade em Hemoglobinopatias .....	72
3.2.1	Avaliação da inexatidão analítica da quantificação da hemoglobina A <sub>2</sub> por equipamento de HPLC (HA 8160 e Variant II) .....	72
3.2.2	Erro total da quantificação da Hb A <sub>2</sub> .....	75
3.2.3	Avaliação da inexatidão analítica da quantificação da hemoglobina F por metodologia de HPLC (HA 8160 e Variant II) .....	76
3.2.4	Erro total da quantificação da Hb F.....	78
3.2.5	Avaliação da inexatidão analítica da quantificação da hemoglobina S por equipamento de HPLC (HA 8160 e Variant II) .....	79
	Tabela 29: Valores de ID entre 2011 e 2014 obtidos na quantificação da Hb S no equipamento HA 8160. ....	80
3.2.6	Erro total da quantificação da Hb S.....	81
3.3	PNAEQ – Avaliação dos resultados no programa de Avaliação Externa da Qualidade em Hemoglobinopatias 2011 – 2014.....	82
3.3.1	Avaliação da participação ativa dos laboratórios e da qualidade das amostras no âmbito do PNAEQ .....	82
3.3.2	Resultados da avaliação do desempenho analítico dos laboratórios participantes no programa de hemoglobinopatias (PNAEQ) 2011- 2014.....	83
4	Conclusões .....	94
5	Bibliografia.....	98
6	Anexos.....	101

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Tipos e percentagem de erros nas três fases do processo analítico laboratorial .....	23
Tabela 2: Regras de Westgard para CQI nos laboratórios clínicos. ....	27
Tabela 3: Classificação do desempenho do laboratório participante .....	34
Tabela 4: Expressão genética da Hb ao longo do desenvolvimento humano.....	37
Tabela 5: Caracterização dos ensaios de AEQ realizados entre 2011 e 2014 no âmbito das hemoglobinopatias .....	53
Tabela 6: Representação do número de ensaios de AEQ em que foram analisadas amostras de Hb A <sub>2</sub> , .....	53
Tabela 7: Análise estatística dos resultados obtidos entre 2011 e 2014, por lote e ano, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II, na determinação da Hb A <sub>2</sub> em amostras de controlo de nível I e II .....	55
Tabela 8: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> de nível I e nível II,.....	56
Tabela 9: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> de nível I e nível II obtidos no equipamento Variant II por lote e ano, entre 2011 e 2014. ....	57
Tabela 10: Análise comparativa dos resultados laboratoriais obtidos nas amostras de controlo para a Hb A <sub>2</sub> com os valores fornecidos pelo fabricante para os diferentes lotes, no equipamento Variant II. ....	59
Tabela 11: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação correspondentes à quantificação da Hb A <sub>2</sub> entre 2011 e 2014, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.....	60
Tabela 12: Análise estatística dos resultados obtidos entre 2011 e 2014, por lote e ano, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II, para determinação da Hb F em amostras de controlo de níveis I e II.....	61
Tabela 13: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb F de nível I e nível II, obtidos no equipamento HA 8160, por lote e ano, entre 2011 e 2014.....	63
Tabela 14: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb F de nível I e nível II, obtidos no equipamento Variant II, por lote e ano, entre 2011 e 2014. ....	64
Tabela 15: Análise comparativa dos resultados laboratoriais obtidos nas amostras de controlo para a Hb F, com os valores fornecidos pelo fabricante, para os diferentes lotes, no equipamento Variant II.....	65
Tabela 16: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação correspondentes à quantificação da Hb F, entre 2011 e 2014, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.....	67
Tabela 17: Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da Hb S em amostras de controlo, entre 2011 e 2014, por lote e ano, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.....	68
Tabela 18: Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da Hb S em amostras de controlo, entre 2011 e 2014, por lote e ano, no equipamento de HPLC HA 8160. ....	69
Tabela 19: Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da Hb S em amostras de controlo, entre 2011 e 2014, por lote e ano, no equipamento de HPLC Variant II.....	70
Tabela 20: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação correspondentes à quantificação da Hb S entre 2011 e 2014, nos equipamentos HA 8160 e Variant II. .	71
Tabela 21: Valor médio de <i>Bias</i> , em cada equipamento, por concentração de Hb A <sub>2</sub> e por ano. ....	73

Tabela 22: Valor médio de <i>Bias</i> em cada equipamento, por ano. ....	73
Tabela 23: Valores de índice de desvio entre 2011 e 2014 obtidos na quantificação da Hb A <sub>2</sub> no equipamento HA 8160.....	74
Tabela 24: Erro total para a quantificação de amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> por equipamento, entre 2011 e 2014.....	75
Tabela 25: Valor médio de <i>Bias</i> em cada equipamento por concentração de Hb F e por ano. ....	77
Tabela 26: Valor médio de <i>Bias</i> em cada equipamento, por ano. ....	77
Tabela 27: Erro total para a quantificação de amostras de controlo de Hb F, por equipamento, entre 2011 e 2014.....	78
Tabela 28: Valor médio de <i>Bias</i> em cada equipamento por ano na determinação de Hb S.....	80
Tabela 29: Valores de ID entre 2011 e 2014 obtidos na quantificação da Hb S no equipamento HA 8160.....	80
Tabela 30: Erro total para a quantificação de amostras de controlo de Hb S, por equipamento, entre 2011 e 2014.....	81
Tabela 31: Número de laboratórios participantes nos ensaios promovidos pelo PNAEQ no âmbito das hemoglobinopatias, entre 2011 e 2014. ....	82
Tabela 32: Estatística dos resultados da quantificação da Hb A <sub>2</sub> obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível normal.....	85
Tabela 33: Tratamento estatístico dos laboratórios participantes para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> (nível normal) .....	85
Tabela 34: Estatística dos resultados da quantificação da Hb A <sub>2</sub> obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC, de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível elevado.....	86
Tabela 35: Tratamento estatístico dos laboratórios participantes para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> (nível elevado). .....	86
Tabela 36: Análise da inexatidão analítica na quantificação da Hb A <sub>2</sub> .....	88
Tabela 37: Estatística dos resultados da quantificação da Hb F obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível normal.....	90
Tabela 38: Tratamento estatístico dos laboratórios participantes para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb F (nível normal). 90	90
Tabela 39: Estatística dos resultados da quantificação da Hb F obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível elevado.....	91
Tabela 40: Tratamento estatístico dos laboratórios para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb F (nível elevado).....	91
Tabela 41: Estatística dos resultados da quantificação da Hb S obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes... 93	93
Tabela 42: Tratamento estatístico dos laboratórios para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb S.....	93



## Índice de Figuras

Figura 1: Fases dos programas de AEQ promovidos pelo PNAEQ.....	18
Figura 2: Representação da estrutura terciária da cadeia $\beta$ -globínica (A) e da estrutura quaternária da Hb A (B) . .....	35
Figura 3: Esquemática dos diferentes tipos de hemoglobina durante as diferentes fases do desenvolvimento humano.....	36
Figura 4: Representação do cromossoma 16 e classificação das $\alpha$ - talassémia e respetivo fenótipo.....	40
Figura 5: Prevalência de portadores de traço $\beta$ -talassémico (A) e de traço Hb S (B) em Portugal continental.....	44
Figura 6: Eletroforese de Hb em membrana de acetato de celulose a pH 8,3:.....	47
Figura 7: Teste de solubilidade para a Hb .....	49
Figura 8: Teste do isopropanol para um Hb instável.....	50
Figura 9: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> , por ano e nível de controlo, obtidos nos equipamentos HA 8160 e Variant II. ....	55
Figura 10: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> , por ano e nível de controlo, no equipamento HA 8160.....	57
Figura 11: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> , por ano e nível de controlo, no equipamento Variant II.....	58
Figura 12: Valor médio dos resultados de Hb A <sub>2</sub> , por lote, de amostras de controlo de nível I (A) e II (B) analisadas no equipamento Variant II, entre 2011 e 2014, em relação ao valor alvo fornecido pelo fabricante e ao valor alvo $\pm 2s$ . ....	59
Figura 13: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação (CV) correspondentes á quantificação da Hb A <sub>2</sub> , entre 2011 e 2014, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.....	60
Figura 14: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb F, por ano e nível de controlo, obtidos nos equipamentos HA 8160 e Variant II. ....	62
Figura 15: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb F, por ano e nível de controlo, no equipamento HA 8160.....	63
Figura 16: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb F, por ano e nível de controlo, no equipamento Variant II.....	65
Figura 17: Valor médio dos resultados de Hb F, por lote, de amostras de controlo I (A) e II (B), analisadas no equipamento Variant II, entre 2010 e 2014, em relação ao valor alvo fornecido pelo fabricante e ao valor alvo $\pm 2s$ .....	66
Figura 18: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação (CV) correspondentes à quantificação da Hb F, entre 2011 e 2014, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.....	67
Figura 19: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb S, por ano, obtidos nos equipamentos HA 8160 e Variant II. ....	68
Figura 20: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb S, por ano, obtidos no equipamento HA 8160.....	69
Figura 21: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb S por ano, obtidos no equipamento Variant II. ....	70
Figura 22: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação (CV) correspondentes à quantificação da Hb S, entre 2011 e 2014, nos equipamentos HA 8160 e Variant II.....	71
Figura 23: Representação da evolução do valor de <i>Bias</i> obtido na quantificação da Hb A <sub>2</sub> , por equipamento e entidade responsável, por programas de AEQ.....	74

Figura 24: Índice de desvio, entre 2011 e 2014, na quantificação da Hb A <sub>2</sub> no equipamento HA 8160.....	74
Figura 25: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> com concentração Hb A <sub>2</sub> <3,5% (A) e concentração Hb A <sub>2</sub> ≥3,5% (B) entre 2011 e 2014, nos equipamentos Variant II e HA 8160.....	75
Figura 26: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb A <sub>2</sub> nos equipamentos Variant II e HA 8160, entre 2011 e 2014.....	76
Figura 27: Representação da evolução do valor de <i>Bias</i> obtidos na quantificação da Hb F, por equipamento e entidade responsável por programas de AEQ.....	77
Figura 28: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb F com concentração Hb F <2,0% (A) e concentração Hb F ≥ 2,0% (B), entre 2011 e 2014. ...	78
Figura 29: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb F nos equipamentos Variant II e HA 8160, entre 2011 e 2014.....	79
Figura 30: Representação da evolução dos valores de <i>Bias</i> obtidos na quantificação da Hb S, por equipamento e entidade responsável por programas de AEQ.....	80
Figura 31: Índice de desvio entre 2011 e 2014, na quantificação da Hb S, no equipamento HA 8160.....	80
Figura 32: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb S, entre 2011 e 2014.....	81
Figura 33: Percentagem de laboratórios que enviaram resultados no programa de hemoglobinopatias, entre 2011 e 2014.....	82
Figura 34: Avaliação das respostas respeitantes à qualidade das amostras enviadas para os laboratórios participantes no programa de hemoglobinopatias (PNAEQ), no período em estudo.....	83
Figura 35: Coeficientes de variação determinados nos ensaios de AEQ para amostras controlo de Hb A <sub>2</sub> .....	87
Figura 36: Representação do nível de inexatidão analítica entre 2011 e 2014.....	89
Figura 37: Coeficientes de variação obtidos nos ensaios de AEQ para amostras com concentração de Hb S, usando todas as metodologias e metodologia de HPLC.....	93

## Índice de siglas e símbolos

AEQ – Avaliação Externa da Qualidade  
CQI – Controle de Qualidade Interno  
CV – Coeficiente de Variação  
DEP – Departamento de Epidemiologia  
DPS – Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis  
EQALM – “*European Quality Association of Laboratory Medicine*”  
ET – Erro total  
EA – Erro aleatório  
ES – Erro sistemático  
Fe – Ferro  
Hb – Hemoglobina  
Hb F – Hemoglobina fetal  
Hb S – Hemoglobina falciforme  
HGM - Hemoglobina globular média  
HPLC – “*High Performance Liquid Chromatography*”  
FIE – Focagem Isoelétrica  
ID – Índice de desvio  
INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge  
ISO – “*International Organization for Standardization*”  
kDa – Quilo Dalton  
L – Liofilizada  
ST – Sangue total  
MH – Método de HPLC  
Mín – Valor mínimo  
Max – Valor máximo  
PI – Ponto isoelétrico  
PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade  
R. Insat. – Resultados insatisfatórios  
s – Desvio padrão  
TM – Todos os métodos  
VGM – Volume globular médio  
UDR – Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência  
UK – NEQAS – “*United Kingdom National External Quality Assessment Service*”  
z – Fator relativo ao nível de confiança desejado  
 $\alpha$  – Alfa  
 $\beta$  - Beta  
 $\delta$  – Delta  
 $\varepsilon$  – Epsilon  
 $\zeta$  – Zeta  
 $\mu\text{m}$  – Micrómetro  
 $\Upsilon$  – Gama

## **Agradecimentos**

A realização desta tese de mestrado marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a sua concretização.

Nomeadamente, à Prof. Doutora Manuela Caniça, na condição de coordenadora de mestrado e orientadora da tese, por todo o conhecimento e apoio transmitido.

Muito especialmente, desejo agradecer às minhas co-orientadoras, Mestre Ana Paula Faria e Mestre Armandina Miranda, por me terem dado a oportunidade de realizar a minha tese numa instituição de elevado prestígio, como o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, bem como pela disponibilidade, atenção dispensada, muita paciência, forte dedicação e profissionalismo que sempre demonstraram ao longo do tempo.

À minha mãe, Idília Vilhena, pelo incentivo, compreensão, paciência e encorajamento demonstrado durante todo este período.

Às minhas colegas de mestrado, pelos momentos de entusiasmo e até de ansiedade, partilhados em conjunto.

## Resumo

O laboratório clínico deve utilizar metodologias de controlo de qualidade que permitam identificar, prevenir e corrigir possíveis falhas e assim garantir a exatidão dos seus resultados. O Controlo de Qualidade laboratorial é de elevada importância quer através da aplicação de metodologias de Controlo de Qualidade Interno (CQI) para avaliação da precisão analítica, quer através da participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) para avaliação da exatidão analítica.

As hemoglobinopatias são doenças monogénicas com transmissão de forma autossómica recessiva, causadas por mutações ao nível dos genes das globinas humanas, que conduzem à síntese reduzida da hemoglobina (talassémias) ou à formação de hemoglobinas estruturalmente anómalas (variantes).

O estudo apresentado incidiu sobre os resultados do CQI e da participação em programas de AEQ da Unidade de Diagnóstico Laboratorial de Referência (UDR) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, bem como dos ensaios de AEQ organizados pelo Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) ao nível do doseamento de Hb A<sub>2</sub>, Hb F e Hb S realizados entre 2011 e 2014.

Ao nível do CQI, verificou-se uma melhoria da precisão analítica no doseamento de amostras controlo de nível de concentração normal para a Hb A<sub>2</sub>, normal e elevado para a Hb F.

O erro total associado ao doseamento da Hb A<sub>2</sub> e da Hb F apresenta, de um modo geral, uma tendência decrescente. Relativamente ao doseamento da Hb S o mesmo só se verifica para as amostras analisadas no equipamento HA 8160.

Entre 2011 e 2014 foram organizados pelo PNAEQ oito ensaios no âmbito das hemoglobinopatias. Os resultados obtidos indicam que, para as diferentes hemoglobinas estudadas, existe uma grande variabilidade nos resultados entre os laboratórios participantes.

**Palavras-chave:** Laboratório; Controlo; Qualidade; Hemoglobinopatias

## **Abstract**

The clinic laboratory must apply methodologies of quality control that allows the identification, prevention and correction of possible errors, and thereby assure the reliability of its results. The laboratory quality control, through implementation of methodologies of internal quality control (IQC) and participation in external quality assessment programs (EQA) is therefore of extremely importance.

The hemoglobinopathies are monogenic diseases with autosomal recessive transmission, caused by genetic mutations in the globin genes. The term hemoglobinopathies encompass the thalassaemias in which there is a reduced rate of synthesis of one of the globin chains and the synthesis of a structurally abnormal hemoglobin.

This study focused on the results of IQC and participation in AEQ programs from the reference laboratory unit of the National Health Institute Doutor Ricardo Jorge (INSA), as well as the AEQ programs organized by National Program of external quality assessment programs (PNAEQ) regarding the Hb A<sub>2</sub>, Hb F and Hb S quantification conducted between 2011 and 2014.

Regarding the IQC, there was an improvement of the analytical accuracy of quantification of samples with normal level of Hb A<sub>2</sub>, and with normal and high concentration of Hb F.

The total error resulting from Hb A<sub>2</sub> and Hb F quantification presents a decreasing trend. The same situation can also be seen on the Hb S quantification in the equipment HA 8160.

Between 2011 and 2014 eight trials regarding hemoglobinopathies were organized by PNAEQ. The results indicate that for the various hemoglobins studied there is a great variability in results between the different laboratories.

**Keywords:** Laboratory; Control; Quality; Hemoglobinopathies

# **1 Introdução**

O primeiro capítulo deste trabalho contém as motivações para o desenvolvimento do tema apresentado, os objetivos e uma abordagem teórica sobre os temas Controlo de Qualidade no Laboratório Clínico e Hemoglobinopatias.

## **1.1 Enquadramento**

O termo Hemoglobinopatia abrange uma ampla gama de patologias causadas por alterações da hemoglobina (Hb). São doenças monogénicas com transmissão de forma autossómica recessiva, causadas por mutações ao nível dos genes das globinas humanas, que conduzem à síntese reduzida da hemoglobina (talassémias) ou à formação de hemoglobinas estruturalmente anómalas (variantes).

Este grupo de patologias teve origem nas regiões tropicais e subtropicais, mas atualmente está presente por todo o mundo devido aos fenómenos de migração, apresentando uma prevalência de 5,0 a 7,0%. Em Portugal, a percentagem de portadores de hemoglobinopatias na população em geral varia entre 0,5 e 2,0% (Kohne, 2011; Martins, Olim, Melo, Magalhaes & Rodrigues, 1993).

A elevada prevalência destas doenças genéticas justifica a importância do diagnóstico precoce, da implementação de programas de prevenção com sensibilização e informação sobre a doença, rastreio da população e aconselhamento genético para os portadores, bem como a disponibilização de meios de diagnóstico pré-natal para casais em risco.

Atualmente os laboratórios clínicos dispõem de várias metodologias que permitem efetuar o rastreio de hemoglobinopatias, tais como as técnicas eletroforéticas ou cromatográficas. O laboratório clínico deve implementar regras que permitam obter resultados o mais precisos e exatos possível, ou seja, implementar medidas de controlo da qualidade.

O Controlo de Qualidade permite aos laboratórios clínicos assegurar a fidedignidade dos seus resultados e melhorar os seus níveis de precisão e exatidão analítica.

O trabalho apresentado foi efetuado no setor de Hemoglobinopatias da Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência (UDR) do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPS) e na Unidade do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) do Departamento de Epidemiologia (DEP) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

A principal motivação para a realização deste trabalho foi a possibilidade de aprofundar os meus conhecimentos na área do controlo da qualidade em laboratório clínico bem como na área das hemoglobinopatias associada à oportunidade de poder conhecer o trabalho desenvolvido numa instituição de referência e de grande prestígio, tanto a nível nacional como internacional, como o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

## 1.2 Objetivos

O estudo apresentado tem como objetivo analisar os resultados dos parâmetros hematológicos associados ao diagnóstico de hemoglobinopatias (quantificação das Hb A<sub>2</sub>, Hb F e Hb S) obtidos entre 2011 e 2014, com vista à implementação de ações de melhoria:

- Na UDR- DPS ao nível dos resultados do controlo interno de qualidade e da avaliação externa da qualidade
- No PNAEQ ao nível dos resultados dos laboratórios participantes nos programas avaliação externa da qualidade no âmbito das hemoglobinopatias.

## 1.3 Caracterização da Organização

### 1.3.1 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge foi fundado em 1899, como Instituto Central de Higiene. Em 1971 foi denominado como Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), terminologia que permanece até à atualidade. O INSA é um instituto público integrado na administração indireta do Ministério da Saúde, dotado de autonomia científica, administrativa, financeira e património próprio (Decreto-Lei n.º 27/2012).

A sua missão consiste “*em contribuir para os ganhos em saúde pública através de atividades de investigação e desenvolvimento tecnológico, atividade laboratorial de referência, observação da saúde e vigilância epidemiológica, bem como coordenar a avaliação externa da qualidade laboratorial, difundir a cultura científica, fomentar a capacitação e formação e ainda assegurar a prestação de serviços diferenciados, nos referidos domínios*” (Decreto-Lei n.º 27/2012).

O INSA, como Laboratório do Estado, apresenta uma maior responsabilidade na investigação científica e desenvolvimento experimental na área das ciências da saúde: investigação



epidemiológica, determinantes da saúde e a avaliação da qualidade dos serviços de saúde pública. Este instituto coopera com os serviços de saúde nacionais, as universidades e centros de investigação nacionais e estrangeiros, os restantes laboratórios do Estado e com outras entidades com atividades semelhantes.

O INSA está dividido em três polos: Sede em Lisboa, Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira, no Porto, e Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac, em Águas de Moura.

### **1.3.2 Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência (UDR)**

O DPS atua nas áreas da promoção da saúde, da literacia em saúde e da prevenção de doenças crónicas.

A UDR está integrada no DPS e atua nas áreas da química clínica, hematologia, imunologia e endocrinologia e tem como objetivo implementar novas metodologias de diagnóstico que permitam uma melhor caracterização analítica de diversas patologias.

No âmbito das hemoglobinopatias, a UDR atua ao nível da:

- Realização de rastreios: identificação de portadores, em colaboração com laboratórios de saúde pública com vista à prevenção do aparecimento de formas graves de hemoglobinopatias
- Detecção de casais em risco
- Confirmação de diagnóstico
- Participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (UK-NEQAS e PNAEQ)
- Colaboração em projetos de investigação
- Formação e ensino.

### **1.3.3 Unidade do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ)**

Em Portugal, o PNAEQ é, desde 1978, a entidade nacional organizadora de programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) em laboratórios clínicos. Os principais objetivos desta unidade são:

- Promoção, organização e coordenação dos programas de AEQ nas diferentes áreas laboratoriais

- Contribuir para a formação dos participantes, promovendo a melhoria do desempenho laboratorial, aumentando o nível da qualidade, beneficiando diretamente o doente e o público em geral e promovendo prospectivamente boas práticas e políticas adequadas de saúde pública
- Divulgar a informação, e os indicadores gerados nos relatórios de avaliação, às entidades envolvidas em todo o processo e aos decisores em saúde
- Comparar o estado da arte a nível nacional
- Aumentar o nível técnico nas diferentes áreas (ex: Imunologia, Virologia, Biologia Molecular, Parasitologia, etc.), enviando bibliografia e dados explicativos.

### 1.3.3.1 Organização do PNAEQ

O PNAEQ constitui uma das unidades do DEP do INSA. Esta unidade engloba uma equipa multidisciplinar, que colabora e participa em diferentes grupos de trabalho nacionais e internacionais recolhendo toda a informação relevante, de modo a promover a melhoria dos serviços prestados e a garantir a ausência de conflito de interesses. As atividades do PNAEQ são desenvolvidas na sede do INSA e nos seus dois polos.

O PNAEQ promove programas de AEQ nas áreas da: Clínica, Genética, “*Point-of-Care Testing*”, Microbiologia de Águas, Microbiologia de Alimentos e Microbiologia do Ar e Anatomia Patológica.

Na implementação dos diferentes programas de AEQ, o PNAEQ segue a metodologia de organização em grupos de trabalho indicada na norma *ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment - General requirements for proficiency testing*. Os grupos de trabalho nacionais são propostos pelo DEP/PNAEQ e nomeados pelo Conselho Diretivo do INSA. A coordenação destes grupos é da responsabilidade do PNAEQ. Os grupos de trabalho desempenham um papel importante na seleção das amostras a incluir nos diferentes ensaios e participam na avaliação dos resultados através da partilha dos conhecimentos técnico-científicos.

À semelhança dos grupos de trabalho, colaboram com o PNAEQ, grupos de peritos, formados por elementos de reconhecida idoneidade, convidados pelo PNAEQ, que executam funções semelhantes às desenvolvidas nos grupos de trabalho.

O PNAEQ é membro da *European Quality Association of Laboratory Medicine* (EQALM) e coopera com outros organizadores de programas de AEQ Internacionais, como por exemplo a *Labquality*.

### **1.3.3.2 Funcionamento Geral de participação no PNAEQ**

Após a divulgação dos ensaios de AEQ organizados pelo PNAEQ, os laboratórios clínicos podem efetuar a sua inscrição de acordo com os prazos estipulados.

A participação em programas do PNAEQ é voluntária e confidencial. A confidencialidade é assegurada pela atribuição de um número, que apenas o laboratório participante e o responsável pela organização do programa tem conhecimento.

O envio dos ensaios é processado segundo as características de cada programa e inclui a entrega de documentos inerentes à sua realização.

O tipo de amostra enviado nos ensaios de AEQ promovidos pelo PNAEQ depende do parâmetro em estudo. Após a receção das amostras, os laboratórios clínicos devem cumprir o protocolo fornecido pelo PNAEQ para a reconstituição das amostras e proceder à sua análise de acordo com a rotina laboratorial.

Os laboratórios participantes devem enviar os seus resultados para o PNAEQ que, posteriormente, realizará a sua avaliação.

O PNAEQ é responsável pela elaboração de relatórios de avaliação do desempenho dos laboratórios participantes nos programas de AEQ. Sempre que seja pertinente e aplicável, serão indicadas recomendações e comentários dos diferentes grupos de trabalho permitindo aos laboratórios a apreciação do seu desempenho, a comparação com os seus pares e a implementação, se necessário, de ações preventivas e corretivas (Figura 1).

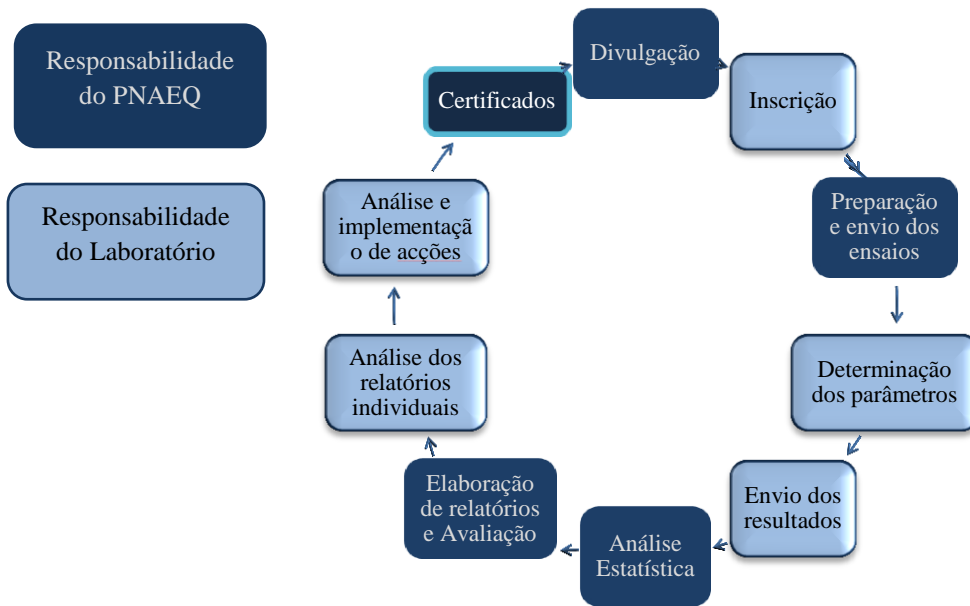


Figura 1: Fases dos programas de AEQ promovidos pelo PNAEQ

### 1.3.3.3 Programa de AEQ em Hemoglobinopatias - PNAEQ

O programa de AEQ no âmbito das hemoglobinopatias desenvolvido pelo PNAEQ tem como objetivo a pesquisa, identificação e quantificação das hemoglobinas A<sub>2</sub>, F e variantes e interpretação dos casos clínicos.

O PNAEQ organiza dois ensaios anuais nos quais são avaliadas uma ou duas amostras para análise e um caso clínico para interpretação. O grupo de laboratórios peritos que colabora com PNAEQ é formado por elementos do Serviço de Patologia Clínica de dois hospitais nacionais e do laboratório da UDR do DPS- INSA.

## 1.4 Caracterização do Laboratório Clínico

### 1.4.1 Laboratório Clínico e termos laboratoriais

De acordo com o despacho nº 8835/2001 (2ª série) do diário da Republica N° 98 de 27 de Abril de 2001, o laboratório clínico é definido como a estrutura onde, sob a responsabilidade de um diretor técnico, são realizados exames laboratoriais (Ministério da Saúde, 2001).

Os principais deveres de um laboratório clínico são garantir a qualidade dos resultados laboratoriais, melhorar a qualidade dos serviços prestados, assegurando a garantia da qualidade nas fases pré e pós analítica, maximizar o impacto dos resultados dos testes laboratoriais nos

cuidados prestados ao doente e associar, sempre que possível, o laboratório clínico a projetos de investigação (Plebani, 2002; Sciacovelli, Secchiero, Zardo, Zaninotto & Plebani, 2006).

Em Portugal, o Decreto-Lei n.º 217/99, de 6 de Outubro de 1999, alterado pelo Decreto-Lei n.º 164/2013, de 6 de Dezembro de 2013, estabelece que “*o funcionamento de qualquer laboratório depende da obtenção de uma licença, a conceder por despacho do Ministro da Saúde, que fixa as valências que o seu titular fica autorizado a desenvolver, os respetivos postos de colheita, bem como os laboratórios com os quais tenha sido celebrado contrato de colaboração*”.

O artigo 10º da Portaria n.º 166/2014 de 21 de Agosto indica que os laboratórios podem receber autorização para desenvolver no mínimo quatro das seguintes valências: Bioquímica; Microbiologia; Hematologia; Imunologia e ou Serologia; Endocrinologia laboratorial e estudo funcional dos metabolismos, órgãos e sistemas; Monitorização de fármacos e toxicologia clínica; Patologia molecular (excluindo genética humana).

No manual de boas práticas clínicas, publicado pelo Ministério da Saúde no despacho n.º 8835/2001, no Diário da República n.º 98, 2ª série, de 27 de Abril, estão descritas as definições dos diversos termos laboratoriais. De seguida são apresentadas as definições consideradas de maior relevância para este estudo:

Avaliação externa da qualidade (AEQ) — anteriormente conhecida como controlo externo da qualidade (CEQ), corresponde à avaliação, por um organismo exterior, da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório.

Controlo da qualidade interno (CQI) — conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados das análises, à medida que as mesmas são executadas.

Exames laboratoriais — exames que contribuem para o diagnóstico, tratamento, monitorização ou prevenção de doenças humanas ou qualquer modificação do estado de equilíbrio fisiológico.

Garantia da qualidade — conjunto de ações pré-estabelecidas e sistemáticas necessárias para se obter a garantia de que um produto ou serviço satisfaz determinadas exigências da qualidade. No âmbito dos exames laboratoriais, a garantia da qualidade abrange obrigatoriamente as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica e inclui também procedimentos de controlo, tais como o CQI e a AEQ.

Procedimentos — instruções escritas, próprias de cada laboratório, descrevendo as operações a efetuar, as precauções a tomar e as medidas a aplicar no laboratório.

Qualidade — aptidão de um produto ou serviço para satisfazer as necessidades expressas ou implícitas do utilizador.

Sistema analítico — conjunto dos meios analíticos constituído por um método, um aparelho ou conjunto de aparelhos, um ou vários reagentes e materiais, uma ou várias amostras de calibração, uma ou várias amostras de controlo, que permite realizar a determinação de um constituinte segundo um procedimento previamente definido.

Sistema da qualidade — estrutura organizacional, responsabilidades, procedimentos, processos e recursos para implementação da qualidade.

#### **1.4.2 Fases do processo laboratorial**

O processo laboratorial pode ser dividido em três fases:

##### **1. Fase pré-analítica**

A norma, “*International Organization for Standardization*” (ISO) 15189 de 2012: Laboratórios clínicos – requisitos particulares para a qualidade e competência, define que a fase pré-analítica engloba os procedimentos iniciais do processo laboratorial, por ordem cronológica, desde a requisição dos exames laboratoriais, preparação e identificação do doente, colheita da(s) amostra(s) ao transporte para e dentro do laboratório (ISO 15189, 2012; Plebani, Sciacovelli, Aita, & Chiozza, 2014).

Na fase pré-analítica, os laboratórios devem ter estabelecidos critérios de aceitação e rejeição aplicados à colheita e ao transporte das amostras. O método de identificação das amostras deve ser claro e simples. O procedimento de colheita das amostras, o recipiente escolhido, a temperatura/duração/segurança do transporte e da receção das amostras no laboratório devem ser monitorizados (Hawkins, 2012).

##### **2. Fase analítica**

A norma ISO 15189 de 2012: Laboratórios clínicos – requisitos particulares para a qualidade e competência, define a fase analítica como o conjunto de procedimentos que permitem determinar um valor ou analisar as características de uma amostra. Esta fase corresponde assim, à etapa de realização do exame laboratorial e pode ser monitorizada pelo CQI e pela participação em programas de AEQ.

Ambos são ferramentas utilizadas na prática laboratorial para garantir que a execução dos testes cumpre os requisitos para a qualidade (ISO 15189, 2012; Plebani, *et al.*, 2014; Vieira, Shitara, Mendes & Sumita, 2011).

### **3. Fase pós-analítica**

A fase pós-analítica abrange os processos que se seguem aos exames laboratoriais, nomeadamente a revisão dos resultados, retenção e armazenamento do material clínico, eliminação de amostras (e descartáveis), formatação, emissão, transmissão dos resultados aos clínicos e arquivo dos resultados dos exames. Esta fase inclui ainda os processos de validação, interpretação dos resultados e decisões clínicas perante o resultado reportado (Vieira, Shitara, Mendes & Sumita, 2011; ISO 15189, 2012).

## **1.5 Controlo de Qualidade no Laboratório Clínico**

### **1.5.1 Qualidade no laboratório clínico**

Nos laboratórios clínicos, a melhoria da qualidade do produto (resultado dos exames) e o seu controlo resultam do aumento das exigências dos clientes e da necessidade de afirmação dos laboratórios no mercado empresarial. É da responsabilidade do laboratório clínico assegurar que os seus resultados reflitam, de forma fidedigna e consistente, o estado clínico dos seus utentes, e que a sua determinação não sofreu qualquer interferência (Chaves, 2013; Plebani, 2002).

O progresso tecnológico na área laboratorial permitiu, além de outros fatores, aumentar a diversidade de amostras avaliadas pelos métodos laboratoriais, contribuindo assim para o aumento da importância do laboratório clínico na decisão médica e na seleção do tratamento (Vieira *et al.*, 2011).

A melhoria contínua dos processos envolvidos deve representar o foco principal de qualquer laboratório. Para tal, deve aplicar metodologias de controlo, nomeadamente programas de controlo de qualidade, que permitam identificar, prever e corrigir possíveis falhas e, assim, minimizar as suas consequências e repetição. A sistematização das atividades envolvidas em todas as etapas dos processos laboratoriais permite alcançar a garantia da qualidade. A gestão da qualidade, por sua vez, abrange as ações utilizadas para produzir, dirigir e controlar essa

qualidade, incluindo a determinação de uma política e de objetivos da qualidade, através da utilização de indicadores e implementação de metas (Chaves, 2013; Plebani, 2002).

A Norma ISO 15189:2012 estabelece os requisitos que um laboratório deve cumprir para que a sua competência na realização de ensaios seja reconhecida. Esta norma de acreditação demonstra, objetiva e independentemente, o compromisso de um laboratório com a qualidade e com a competência técnica. Ao seguir esta norma o laboratório assegura que os seus resultados são fidedignos e que contribuem de forma mais correta para o diagnóstico clínico.

### **1.5.1.1 Erros nos laboratórios clínicos**

O papel do laboratório nos cuidados prestados aos doentes é fundamental e estima-se que os resultados laboratoriais influenciam cerca de 60 a 70% das decisões clínicas. Devido a este elevado nível de influência, a qualidade dos testes laboratoriais é extremamente importante. Consequentemente, as análises laboratoriais executadas de forma incorreta poderão constituir uma importante fonte de erro, o que pode afetar a segurança do doente (Rin, 2009; Hawkins, 2012; Plebani, 2006).

De acordo com a norma ISO 22367:2008 “*Medical laboratories - Reduction of error through risk management and continual improvement*”, o erro laboratorial é definido como a utilização de uma estratégia incorreta para atingir um objetivo. A realização de uma revisão das não conformidades e dos erros laboratoriais em intervalos regulares, bem como dos efeitos das ações preventivas e corretivas, irá permitir a melhoria da qualidade dos serviços prestados pelos laboratórios clínicos. Esta norma define como ações preventivas aquelas que se destinam a evitar o aparecimento de uma não conformidade ou que promovam a melhoria contínua e ações corretivas as que se sucedem após a identificação de uma não conformidade ou de um erro. As ações corretivas devem conduzir à diminuição da frequência da não conformidade ou evitar o desenvolvimento de uma não conformidade associada (Plebani, 2006; ISO 22367, 2008; Hawkins, 2012; Plebani, 2014).

Os erros laboratoriais podem ser classificados de acordo com: fase do ciclo analítico; local onde o erro teve origem: intra ou extra laboratório; responsabilidade sob o erro; possibilidade de serem evitados e impacto nos cuidados prestados ao doente. Esta classificação permite aos laboratórios clínicos reconhecer as causas dos erros, identificar os processos com elevado risco de ocorrência



de erro, estimar, avaliar e controlar o risco associado aos cuidados prestados aos doentes bem como monitorizar a eficácia dos programas de controlo de qualidade (Plebani, 2006).

Os erros laboratoriais podem ocorrer em qualquer fase do ciclo do laboratório, no entanto, a percentagem de erros associados às duas fases extra-analíticas é 4 a 5 vezes superior à registada na fase analítica (Tabela 1).

Tabela 1: Tipos e percentagem de erros nas três fases do processo analítico laboratorial (Rin, 2009; Hawkins, 2012)

<b>Fase do processo analítico</b>	<b>Tipo de erro</b>	<b>Percentagem de erro (%)</b>
<b>Pré-analítica</b>	Requisição de um teste inadequado	<b>46 – 68,2</b>
	Identificação incorreta do doente	
	Recipiente incorreto	
	Identificação incorreta do recipiente	
	Colheita e transporte incorretos da amostra	
	Volume de amostra insuficiente	
	Erro na rotulagem	
	Contaminação biológica	
<b>Analítica</b>	Funcionamento incorreto do equipamento	<b>7-13</b>
	Interferências (endógenas ou exógenas)	
	Falha não detetada no controlo da qualidade	
<b>Pós-analítica</b>	Validação incorreta dos resultados	<b>18,5 – 47</b>
	Introdução incorreta dos resultados	
	Erro no relatório clínico	
	Demora na disponibilização dos resultados ao clínico responsável	

Os erros analíticos também podem ser classificados como:

- Erro aleatório: o erro ocorre de forma imprevisível e, portanto, não é passível de ser evitado. Estes erros sucedem, principalmente, nas fases de manipulação e processamento das amostras e resultam na diminuição da precisão analítica (Oliveira & Mendes 2010; VIM, 2008).
- Erro sistemático: erro que ocorre de forma regular e constante, resultando na perda da exatidão (Oliveira & Mendes 2010; VIM, 2008).

### 1.5.2 Controlo da Qualidade Interno

Em 1981, a Organização Mundial de Saúde definiu como CQI “o conjunto de procedimentos utilizados na avaliação contínua do trabalho desenvolvido no laboratório e dos seus resultados”. Assim, o CQI consiste no conjunto de procedimentos aplicados com regularidade na monitorização do desempenho dos métodos analíticos, deteção de possíveis erros, devido ao mau

funcionamento do sistema, condições ambientais adversas ou mau desempenho do operador, e correção de problemas antes da entrega dos resultados ao doente ou ao médico (Pang, 2009).

### 1.5.2.1 Evolução Histórica do CQI

O conceito de CQI do processo analítico foi introduzido na química clínica através dos gráficos de Levey-Jennings com base nas teorias de *Shewhart* para o controlo de qualidade dos produtos industriais. Em 1977 Westgard e colegas constataram que 5% dos resultados analíticos eram rejeitados sem razão fundamentada. Foram assim estudadas várias regras de controlo com recurso a aplicações informáticas, atualmente conhecidas como regras de Westgard (Westgard, *et al.*, 1981).

### 1.5.2.2 Procedimento de CQI

As etapas essenciais na construção de um procedimento de CQI são as seguintes:

1. Previsão do desempenho do CQI: a abordagem básica do CQI envolve a análise do material de controlo em simultâneo com as amostras dos doentes. O laboratório deve estabelecer a frequência, o tipo e número de testes de controlo de qualidade para monitorizar todo o processo analítico.
2. Seleção de um procedimento de CQI apropriado: procedimento que apresenta uma probabilidade de 90% de detetar erros clinicamente importantes e um máximo de 5% de falsas rejeições.
3. Implementação de um programa de CQI: programa que cumpra os critérios estatísticos, regras de controlo ou que o número de determinações do controlo realizadas esteja em concordância com o nível de qualidade exigido (Pang, 2009).

Na elaboração de um sistema de controlo de qualidade é importante ter em consideração os seguintes aspetos: procedimentos escritos; garantia da responsabilidade de monitorização e revisão de resultados; formação do pessoal; qualidade, número e tipo dos materiais de controlo; recolha de dados; valores alvo estabelecidos; cartas de *Levey-Jennings* estabelecidas; gráficos com os resultados dos controlos determinados nos ensaios de rotina; ações corretivas estabelecidas; documentação atualizada dos programas de controlo; tipo e frequência dos erros;

número de repetições dos testes de controlo e probabilidade de detetar erros e falsos negativos (Pang, 2009; Petersen *et al.*, 1996).

Não é possível estabelecer um sistema de controlo comum para todos os métodos analíticos, cada método deverá ter o seu próprio sistema de CQI (Petersen *et al.*, 1996).

Nos procedimentos de CQI deverão ser utilizados, pelo menos, dois níveis de concentração de amostra controlo. Um deverá representar a concentração do analito em condições fisiológicas e o outro em condições patológicas (Fuentes-Arderiu, *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 1996).

Uma vez que cada lote de amostra controlo contém valores diferentes do analito em estudo, é necessário elaborar uma nova carta controlo sempre que se inicia um novo lote. A reconstituição das amostras deverá ser realizada de acordo com as indicações do fabricante. Na fase da alíquotagem a amostra é distribuída por alíquotas de concentrações idênticas. Cada determinação da amostra corresponde a um ponto na carta de controlo. Os intervalos de CQI são determinados através dos valores da média e de desvio padrão obtidos nas primeiras 20 determinações realizadas em datas diferentes com base na exigência de qualidade do ensaio (Westgard, *et al.*, 1981).

Através da análise da carta de controlo é possível verificar se alguma das regras foi violada e identificar o tipo de erro (aleatório ou sistemático). A origem da não conformidade deve ser determinada e corrigida de imediato (Westgard *et al.*, 1981).

### **1.5.2.3 Características das amostras de controlo de CQI**

As principais características das amostras de controlo são as seguintes:

1. Semelhança às amostras de origem humana (sangue, plasma, soro, etc.)
2. Concentração do analito clinicamente representativa
3. Composição da matriz o mais semelhante possível à amostra de origem humana
4. Estável durante um longo período de tempo
5. Baixa variabilidade
6. O material de controlo deve estar pronto a utilizar
7. Aplicadas com o mínimo de preparação possível
8. Manuseamento idêntico às amostras dos doentes (Pang, 2009; Petersen *et al.*, 1996; Vieira *et al.*, 2011).

As amostras de controlo são de valor conhecido e a sua monitorização é obtida através de análise estatística, nomeadamente através da média, desvio padrão e coeficiente de variação. Os gráficos de Levey Jennings e as regras de Westgard são as principais ferramentas aplicadas a nível mundial na avaliação do CQI (Vieira *et al.*, 2011).

#### 1.5.2.4 Regras de Westgard

A maioria dos laboratórios clínicos segue as regras de controlo de qualidade estabelecidas por Westgard no início dos anos 80.

Westgard avaliou a eficiência e a adequabilidade das várias regras de controlo de qualidade em uso e demonstrou que os procedimentos de controlo de qualidade devem nominalmente consistir em, pelo menos, duas regras de controlo: uma deve ser sensível ao erro sistemático e a outra ao erro aleatório. A combinação destas regras, tipicamente conhecidas como regras de controlo de Westgard, é essencial nos sistemas de informação de todos os laboratórios clínicos.

Um dos princípios fundamentais das regras de Westgard consiste na distribuição gaussiana dos erros. Por este motivo, apenas são aplicáveis às determinações quantitativas (Westgard, 2013; <http://www.westgard.com/westgard-rules-and-multirules.htm> acedido a 5 de outubro de 2014).

A regra de Westgard que não foi cumprida permite identificar o tipo de erro analítico que ocorreu durante o procedimento (Tabela 2).

#### 1.5.2.5 Medidas de desempenho do CQI

A precisão corresponde à capacidade do método, em determinações repetidas numa mesma amostra, fornecer resultados semelhantes. Este processo permite avaliar a reprodutibilidade dos resultados e, assim, avaliar o CQI.

O erro gerado pela **imprecisão analítica** designa-se por erro aleatório.

O coeficiente de variação (CV) exhibe de forma percentual, a imprecisão do método em determinações distintas, logo deve ser determinado regularmente (Oliveira & Mendes 2010).

A fórmula desta medida é a seguinte:

**Coeficiente de variação**

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

s representa o desvio padrão e  $\bar{x}$  a média dos valores.

Tabela 2: Regras de Westgard para CQI nos laboratórios clínicos.

Regra	Descrição do critério de rejeição	Tipo de erro detetado
$1_{2s}$	Regra de controlo utilizada quando os limites de controlo calculados são $x \pm 2s$ . No procedimento original de Westgard, esta regra é utilizada como um alerta, para provocar a análise das outras regras.	Erro aleatório
$1_{3s}$	Regra de controlo utilizada quando os limites de controlo calculados são $x \pm 3s$ . A corrida é rejeitada quando uma única medição de controlo excede um dos limites	Erro sistemático
$2_{2s}$	Rejeita-se quando 2 medições de controlo consecutivas excedem o mesmo limite de controlo $x + 2s$ ou $x - 2s$	Erro sistemático
$R_{4s}$	Rejeita-se quando 1 medição de controlo excede o limite de controlo $x + 2DP$ e a outra $x - 2DP$ , na mesma corrida	Erro aleatório
$3_{1s}$	Três pontos consecutivos da amostra de controlo ultrapassam $\pm 1s$ do mesmo lado da linha central.	Erro sistemático
$4_{1s}$	Rejeita-se quando 4 medições de controlo consecutivas excedem o mesmo limite $1s$ .	Erro sistemático
$10x$	Rejeita-se quando 10 medições de controlo consecutivas estiverem no mesmo lado em relação à média	Erro sistemático

s – desvio padrão

### 1.5.3 Avaliação Externa da Qualidade

De acordo com a norma ISO 17043:2010 “*Conformity assessment — General requirements for proficiency testing*”, os programas de AEQ consistem na avaliação do desempenho de um laboratório em comparação com outros laboratórios. A participação em programas de AEQ permite fornecer aos laboratórios participantes e autoridades da saúde uma estimativa sobre o grau de incerteza e constitui um indicador eficaz sobre a participação do laboratório em processos de acreditação e certificação (ISO 17043, 2010).

As principais vantagens da participação em programas de AEQ são:

- Obtenção de uma visão sobre o seu desempenho
- Melhoria dos padrões locais ou nacionais
- Estimulo para a melhoria contínua
- Avaliação da eficácia dos procedimentos de CQI
- Demonstração de um compromisso com a qualidade
- Avaliação de desempenho dos métodos

### 1.5.3.1 Evolução histórica dos Programas de Avaliação Externa da Qualidade

A origem dos programas de AEQ, remonta ao estudo pioneiro de Belk e Sunderman de 1947 (Ceriotti, 2014). Nesta altura, a AEQ era apenas utilizada para identificar os métodos com fraco desempenho. A AEQ evoluiu de exercícios esporádicos para a avaliação de um número restrito de analitos para uma prática regular. No final dos anos 60, a AEQ já constituía uma ferramenta muito útil para a identificação de erros. Os programas de AEQ deram destaque à baixa inexatidão dos métodos manuais. Nos anos 70, AEQ tornou-se uma prática mais regular e a introdução dos métodos automatizados contribuiu para o aumento da precisão dos métodos analíticos (Ceriotti, 2014; Libeer, 2001).

Em 1978 foi publicado pela “*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*” um conjunto de recomendações provisórias para a AEQ e a descrição dos seus objetivos. Este documento define os programas de AEQ como instrumentos necessários para a definição do estado da arte do laboratório.

A norma europeia 14136 de 2004: Utilização de programas de AEQ na avaliação do desempenho dos procedimentos de diagnóstico *in vitro*, veio estabelecer os métodos de vigilância dos programas de AEQ e disponibilizar alguns conceitos básicos. A norma 17043 “*Conformity assessment — General requirements for proficiency testing*” de 2010, por sua vez, especifica os requisitos gerais para o desenvolvimento de um programa de AEQ (Ceriotti, 2014; ISO 17043, 2010).

### 1.5.3.2 Objetivos dos programas de AEQ

Os programas de AEQ têm como objetivos:

1. Avaliação do desempenho dos participantes

Os critérios de avaliação dos resultados laboratoriais num programa de AEQ são extremamente importantes: Se forem pouco rigorosos, laboratórios com baixo desempenho não serão identificados, se, no entanto, forem demasiado rigorosos, os laboratórios com bom desempenho serão falsamente rejeitados (Sciacovelli, et al, 2004).

Esta avaliação decorre em todos os programas de AEQ (Libeer, 2001).

A obtenção de resultados aceitáveis num programa de AEQ indica que o laboratório apresenta capacidade para produzir resultados fidedignos e são uma forte evidência que os procedimentos

analíticos estão sob controlo, que o trabalho dos técnicos é adequado e que as regras de CQI foram cumpridas. Esta informação tranquiliza os profissionais do laboratório e representa uma evidência da conformidade e comparabilidade dos resultados entre laboratórios.

No entanto, um mau desempenho num programa de AEQ pode ser consequência da má qualidade das amostras controlo, falha do método analítico ou ainda devido a erro dos participantes. Com exceção da primeira possibilidade, o laboratório é responsável pela identificação da causa do erro e pela implementação de ações corretivas e preventivas. O insucesso dos participantes conduz à reavaliação e modificação dos procedimentos e métodos aplicados no laboratório, e eventualmente à melhoria da formação e competência dos profissionais (Plebani, 2005).

O número de laboratórios identificados com fraco desempenho nos programas de AEQ depende dos critérios estabelecidos, mas pode sofrer influências do tratamento estatístico aplicado (Sciacovelli *et al*, 2004).

A avaliação do desempenho do laboratório também engloba a avaliação dos seus profissionais, nomeadamente a sua capacidade de interpretação de resultados, sugestões para o diagnóstico e para estudos laboratoriais posteriores (Lieber, 2001).

## 2. Avaliação do desempenho dos métodos

Através da comparação dos resultados de diferentes utilizadores do mesmo método, é possível avaliar o desempenho inerente ao método. Este tipo de avaliação implica a participação de um número significativo de utilizadores do método em estudo (Lieber, 2001).

## 3. Formação e aconselhamento

A participação em programas de AEQ não garante por si só uma melhoria da qualidade dos resultados laboratoriais. Os profissionais do laboratório têm o dever de analisar os relatórios da AEQ, discutir os resultados obtidos, e determinar as possíveis ações que deverão ser tomadas para melhorar o desempenho do laboratório. A informação disponibilizada pela AEQ apenas é eficaz se o laboratório realizar as ações apropriadas para garantir a melhoria do seu trabalho (Sciacovelli *et al*, 2006).

### **1.5.3.3 Etapas da AEQ**

Cabe aos laboratórios a seleção dos programas de AEQ em que pretendem participar. Após a inscrição dos laboratórios nos programas de AEQ, a entidade organizadora é responsável pela

preparação e envio das amostras de controlo para os laboratórios participantes. Sempre que se justifique, deverá ser enviada informação clínica pertinente para o estudo em causa juntamente com a amostra. Os laboratórios participantes devem aplicar às amostras de controlo o mesmo procedimento aplicado às amostras dos doentes. De seguida, os resultados das amostras são enviados à entidade organizadora do programa de AEQ que, por sua vez, irá realizar o tratamento estatístico dos resultados bem como a sua análise e interpretação. Posteriormente, enviará um relatório de avaliação dos resultados a cada laboratório participante.

#### **1.5.3.4 Características das amostras de controlo da AEQ**

O organismo responsável pela organização do programa de AEQ deve estar apto a demonstrar a qualidade dos materiais utilizados. Estes devem apresentar homogeneidade, estabilidade (para garantir que não sofrem alterações significativas durante o processo em estudo) e estar em conformidade com as normas de segurança. As amostras de controlo devem ser avaliadas da forma mais semelhante possível ao processo aplicado nas amostras dos doentes (Sciacovelli *et al*, 2004). De acordo com a norma ISO 17043:2010 “*Conformity assessment — General requirements for proficiency testing*”, os participantes deverão receber informações sobre: o manuseamento e a determinação das amostras de controlo; os fatores que possam influenciar o ensaio ou a calibração dos parâmetros (condições de armazenamento e transporte da amostra, intervalo de tempo até à medição da amostra); o procedimento detalhado sobre a reconstituição da amostra, preparação e respetivo acondicionamento; as instruções sobre o tratamento da amostra após a sua reconstituição, incluindo requisitos de segurança; as condições ambientais específicas para a realização dos ensaios; as instruções específicas e detalhadas sobre a forma de registo e comunicação dos resultados.

#### **1.5.3.5 Valor Alvo**

A norma 17043:2010 “*Conformity assessment — General requirements for proficiency testing*” especifica os requisitos gerais, a nível técnico e de gestão, para a competência das entidades organizadoras de programas de AEQ.

Esta norma define como valor alvo o valor atribuído a um parâmetro específico do ensaio de AEQ. O método de determinação deste valor é da responsabilidade da entidade organizadora do



programa de AEQ. Este procedimento deve ter em conta a rastreabilidade e a incerteza de medição exigida para demonstrar que o programa de AEQ está apto para a sua finalidade.

O valor pode ser determinado com recurso a (ISO 13528: 2005; ISO 17043, 2010):

- Valores conhecidos – resultados determinados através da análise de um item específico de um teste de AEQ
- Valores de referência certificados: determinados através de testes definitivos
- Valores de referência: determinado através da comparação por outro instrumento de medição rastreável, através de padrões nacionais ou internacionais.
- Valores de consenso determinados a partir de resultados de grupos de peritos: os laboratórios peritos, que em algumas situações podem ser laboratórios de referência, efetuam a determinação do valor alvo da amostra de controlo através da utilização de equipamentos ou métodos específicos, reconhecidos por serem altamente precisos e comparáveis aos métodos usualmente utilizados em laboratório clínico;
- Valores de consenso determinados pelos resultados de participantes através da aplicação dos métodos estatísticos descritos na norma ISO 13528: 2005 “*Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*” e tendo em consideração os efeitos dos *outliers*.

#### **1.5.3.6 Características dos relatórios de avaliação**

A entidade organizadora dos programas de AEQ elabora os relatórios a partir dos resultados obtidos pelos laboratórios participantes. Os relatórios devem ser claros e de fácil compreensão, incluir os resultados de todos os participantes juntamente com a indicação do desempenho de cada laboratório. A informação presente nestes relatórios permite a cada laboratório ter conhecimento desse seu desempenho e compará-lo com os restantes participantes.

Os relatórios de avaliação, entre outras características devem apresentar: resultados dos participantes; número de participantes; indicação dos procedimentos utilizados para o tratamento estatístico dos resultados, tratamento de *outliers* e avaliação do desempenho dos resultados; esquemas e representações gráficas dos dados estatísticos; interpretação dos dados estatísticos; informação sobre o tipo de amostra de controlo e detalhes sobre a rastreabilidade metrológica e a incerteza de medição do valor alvo da amostra; comentários sob o desempenho dos participantes por parte da organização e do grupo de peritos; avaliação do desempenho do laboratório.

### 1.5.3.7 Análise estatística

Uma análise estatística adequada permite, para a mesma amostra controlo, comparar resultados de diferentes laboratórios clínicos. Assim, qualquer diferença nos resultados obtidos nos diferentes laboratórios não deverá conduzir a interpretações diferentes na determinação do diagnóstico clínico (Sciacovelli *et al*, 2004).

A entidade responsável pelo programa de AEQ deve registar e analisar os resultados obtidos pelos diferentes laboratórios participantes, através da aplicação de métodos estatísticos apropriados. Os procedimentos devem ser definidos e implementados para verificar a validade dos dados introduzidos, transferência de dados, análise estatística e relatórios.

Para uma correta análise estatística dos resultados é necessário ter em conta o número de resultados, a identificação do método, classificação dos dados (todos os resultados, independentemente do método, resultados de acordo com a relação método/equipamento), procedimentos utilizados na identificação dos *outliers* e na determinação do valor alvo (Sciacovelli *et al*, 2004).

A análise estatística deve fornecer estimativas fidedignas do valor alvo e da variabilidade inter-laboratório. A informação resultante dos programas de AEQ pode diferir dependendo dos critérios aplicados no tratamento de resultados e diferentes técnicas podem ser aplicadas de acordo com os objetivos pretendidos.

Frequentemente, nos programas de AEQ, o valor alvo corresponde a um valor de consenso, ou seja à média dos resultados dos laboratórios participantes. Quando o valor alvo é determinado de acordo com o método aplicado pode ser influenciado pelo sistema de diagnóstico predominante. Neste caso, o mais apropriado seria aplicar um valor de consenso associado a cada sistema de diagnóstico (Sciacovelli *et al*, 2004).

A norma ISO 13528 de 2005 “*Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*” estabelece os procedimentos estatísticos a aplicar na análise resultados dos programas de AEQ.

### 1.5.3.8 Medidas de desempenho laboratorial

Os resultados de um programa de AEQ devem refletir o desempenho de um laboratório comparativamente a outros laboratórios. O objetivo consiste em medir o desvio entre o resultado do laboratório participante e o valor alvo, de modo a permitir a avaliação dos desempenhos.

A inexatidão analítica avalia o desempenho analítico do laboratório comparativamente a outros laboratórios ou padrões de referência. Esta é avaliada através da determinação do *bias* (ou erro sistemático ou viés) ou o *Standard Deviation Index* (Índice de Desvio).

#### **Bias laboratorial**

O *Bias* corresponde à diferença entre o valor obtido pelo laboratório na avaliação da amostra do programa de AEQ e o valor alvo atribuído ao parâmetro (ISO 17043, 2010; Oliveira & Mendes, 2010).

$$Bias = x - X$$

Onde  $x$  corresponde ao valor obtido pelo laboratório participante e  $X$  ao valor alvo.

O *Bias* também pode ser apresentado sob a forma de percentagem de acordo com a seguinte equação:

$$Bias_{\%} = 100 \times \frac{x - X}{X}$$

#### **Índice de desvio ou Z-score**

O Z-score, também designado pelos organizadores de AEQ por índice de desvio (ID), é calculado de acordo com a equação:

$$Z\text{-score}/ID = \frac{x - X}{s \text{ grupo}}$$

Onde  $x$  corresponde ao valor obtido pelo laboratório participante e  $X$  ao valor alvo.

O valor obtido é aplicado como indicador de desempenho do laboratório participante no programa de AEQ comparativamente aos outros laboratórios, o valor alvo é o valor atribuído a um determinado parâmetro pela entidade responsável pelo ensaio de AEQ e o desvio padrão do grupo corresponde ao desvio padrão proveniente dos resultados de todos os laboratórios participantes. O índice de desvio é utilizado preferencialmente na monitorização dos procedimentos de AEQ. Este indicador associa o desvio apresentado pelo laboratório ao valor de

referência. Fornece o número de desvios que afasta o resultado do laboratório da média obtida pelos restantes laboratórios (ISO 17043, 2010; Oliveira & Mendes, 2010).

O desempenho laboratorial pode ser classificado de acordo com o valor do índice de desvio, como está representado na tabela 3:

Tabela 3: Classificação do desempenho do laboratório participante em programa de AEQ através do valor do z-score (ISO 17043, 2010).

<b>Intervalo z-score</b>	<b>Desempenho</b>
$ z\text{-score}  \leq 2,0$	Satisfatório
$2,0 <  z\text{-score}  < 3,0$	Questionável (sinal de aviso)
$ z\text{-score}  \geq 3,0$	Insatisfatório (sinal de ação)

De acordo com a norma 17043 de 2010, quando um participante obtém um resultado que origina um valor de z-score superior ou igual ao módulo de 3,0 o resultado será considerado como um "sinal de ação". Valores dentro do intervalo 2,0 a 3,0 são indicativos de "sinal de aviso". Para um "sinal de ação" num só ensaio ou dois "sinais de aviso" em ensaios sucessivos, a ISO 13528:2005 considera como evidência de que uma anomalia ocorreu e requer investigação sobre as causas do problema (ISO 13528, 2005; ISO 17043, 2010).

#### 1.5.4 Erro total analítico

O erro total analítico corresponde à associação entre o erro aleatório e o erro sistemático, ou seja, entre o CQI e a AEQ. A forma mais comum de determinar o erro total corresponde à soma do erro sistemático com o erro aleatório (Oliveira & Mendes, 2010):

$$ET = ES + z \cdot EA$$

Onde:

ET = Erro total

ES = Erro sistemático (*Bias*)

EA = Erro aleatório (coeficiente de variação determinado através do CQI)

z = Fator relativo ao nível de confiança desejado (z= 1,65 para 90%; z= 1,96 para 95%)

As especificações da qualidade para o erro total de um ensaio definem a variação máxima aceitável num determinado resultado laboratorial, obtida através dos efeitos combinados dos erros aleatórios e sistemáticos.

## 1.6 Hemoglobinopatias

### 1.6.1 Estrutura e funções da hemoglobina

A hemoglobina (Hb) encontra-se presente nos glóbulos vermelhos e é responsável pelo transporte do oxigénio para os tecidos e pelo transporte do dióxido de carbono (cerca de 10%) dos tecidos para os pulmões.

A Hb é uma proteína tetramérica constituída por quatro cadeias polipeptídicas ligadas a um grupo heme, sendo duas cadeias tipo alfa ( $\alpha$ ) e duas do tipo não  $\alpha$ . Esta molécula apresenta um peso molecular de 64 – 64,5 kDa (Bain, 2006; Rappaport, Velasquez & Williams, 2004; Sarnaik, 2005).

A estrutura da Hb é altamente complexa e pode ser classificada em quatro níveis (Bain, 2006):

1. Estrutura primária: sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica
2. Estrutura secundária: formação de estruturas em hélice
3. Estrutura terciária: arranjo tridimensional da estrutura secundária numa cadeia polipeptídica (Figura 2 A)
4. Estrutura quaternária: relação entre as quatro cadeias globínicas (Figura 2 B)

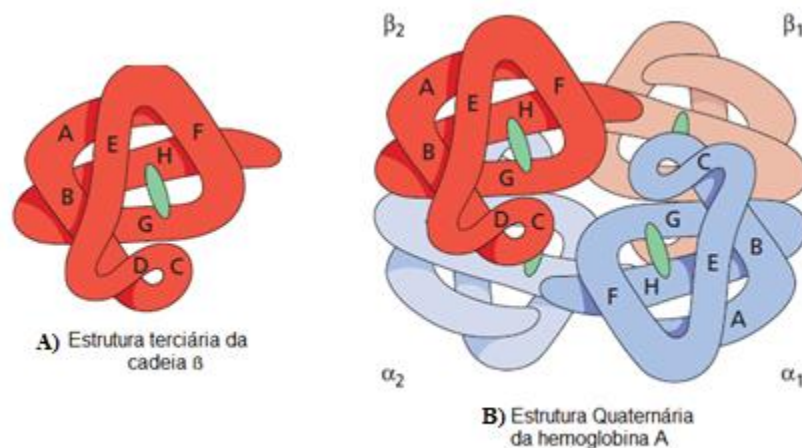


Figura 2: Representação da estrutura terciária da cadeia  $\beta$ -globínica (A) e da estrutura quaternária da Hb A (B) (Adaptado de Bain, 2006).

O grupo heme é essencial para o transporte das moléculas de oxigénio, enquanto que as cadeias de globina protegem o grupo heme da oxidação. A estrutura da Hb cria um ambiente de radicais hidrofóbicos que protegem o ferro do grupo heme, da água e assim da oxidação. Os radicais externos são hidrofílicos e conferem solubilidade à molécula. Na Hb o ferro apresenta-se

normalmente na sua forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ). O grupo heme pode estar ligado ao oxigénio de forma reversível, o que permite à Hb desempenhar a sua função de transporte (Bain, 2006).

A nível genético, a cadeia  $\alpha$  é codificada em duplicado no cromossoma 16 e as cadeias não alfa são codificadas no cromossoma 11 (Figura 3). Assim, uma célula diplóide apresenta quatro genes que codificam as cadeias alfa e dois a cadeia beta. As cadeias alfa e beta são formadas, respetivamente, por 141 e 146 aminoácidos (Clarke et al, 2000; Hartevelde, 2014; Rappaport, 2004).

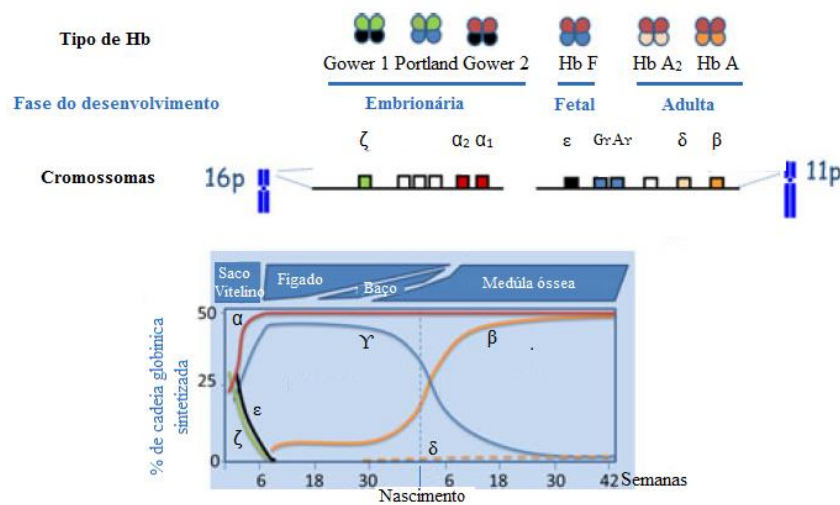


Figura 3: Esquematização dos diferentes tipos de hemoglobina durante as diferentes fases do desenvolvimento humano (Adaptado de Hartevelde, 2014).

### 1.6.2 Síntese da hemoglobina durante o desenvolvimento

No Homem existem seis espécies distintas de Hb, três estão presentes na fase embrionária (Gower 1, Gower 2 e Portland) e as restantes são expressas durante a fase fetal e na vida adulta: Hb A, Hb A<sub>2</sub> e Hb F (Tabela 4) (Rappaport, 2004).

O padrão de síntese de Hb durante as fases embrionária, fetal e adulta do desenvolvimento do ser humano está representado na Figura 3.

Os genes  $\zeta$  e  $\epsilon$  apenas estão ativos durante a fase embrionária, com produção de Hb Gower-1, Gower-2 e Portland. A Hb Gower 1 ( $\zeta_2/\epsilon_2$ ) e a Hb Portland ( $\zeta_2/\gamma_2$ ) são as únicas que não dependem da síntese da  $\alpha$ -globina (Rappaport, 2004; Clarke & Higgins, 2000; Hartevelde, 2014).

Os genes  $\alpha$  são expressos durante a vida fetal e adulta e são responsáveis pela produção de Hb F, Hb A e Hb A<sub>2</sub>. O padrão de síntese da Hb durante o desenvolvimento explica como os genótipos elevados que envolvem os quatro genes  $\alpha$  se manifestam logo na fase pré e pós-natal, enquanto

que os genes  $\beta$ -globina apenas se manifestam na fase pós-natal. Assim, o quadro clínico da anemia das células falciformes e das  $\beta$ -talassémias apenas se torna evidente no segundo trimestre de vida, fase em que a Hb A deveria substituir a Hb F (Hartevelde, 2014; Ryan *et al.*, 2010).

Tabela 4: Expressão genética da Hb ao longo do desenvolvimento humano (Rappaport, 2004).

Fase de desenvolvimento	Hemoglobina	Cadeias globínicas
Embrionária	Gower 1	$\zeta_2 \epsilon_2$
	Portland	$\zeta_2 \gamma$
	Gower 2	$\alpha_2 \epsilon_2$
Fetal	Hb F	$\alpha_2 \gamma_2$
	Hb A <sub>2</sub>	$\alpha_2 \delta_2$
Adulta	Hb A	$\alpha_2 \beta_2$
	Hb A <sub>2</sub>	$\alpha_2 \delta_2$
	Hb F	$\alpha_2 \gamma_2$

Na fase fetal existe o predomínio da Hb fetal (Hb F), constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias gama ( $\alpha_2 \gamma_2$ ). A Hb fetal representa 90 a 95% do total de Hb presente entre as 34 e 36 semanas de gestação. A percentagem Hb A ( $\alpha_2/\beta_2$ ) no feto é de 4 a 13 %. A Hb F apresenta maior afinidade pelo oxigénio do que Hb A, o que permite o transporte do oxigénio para os tecidos periféricos no meio fetal. No terceiro trimestre, os genes responsáveis pela síntese das globinas  $\beta$  e  $\delta$  tornam-se ativos o que resulta no aumento da Hb A e da Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2/\delta_2$ ) (Rappaport, 2004). No final da gravidez, a Hb F representa 53 a 95% da Hb e a Hb A pode atingir os 20 a 30%. Devido à longa durabilidade dos glóbulos vermelhos circulantes, a Hb F é lentamente substituída pela Hb A. A percentagem de Hb F começa a diminuir após as duas primeiras semanas de vida, cerca de 3% por semana e corresponde a cerca de 2 a 3% do total da Hb aos seis meses de idade. Aos três meses de idade a Hb A já é a Hb predominante. A Hb A<sub>2</sub> é produzida em pequenas quantidades após o parto e aos seis meses de idade atinge valores correspondentes à fase adulta. Assim as patologias associadas à síntese da  $\beta$ -globina apenas se manifestam clinicamente depois dos seis meses de idade Na fase adulta, os valores normais de Hb A são cerca de 96 % e de Hb A<sub>2</sub> variam entre 1 e 3 % (Rappaport, 2004; Ryan *et al.*, 2010; Sarnaik, 2005).

### 1.6.3 Classificação das hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias podem ser classificadas como:

- Talassémias - desequilíbrio na síntese das cadeias globínicas, devido a ausência ou diminuição da síntese de uma ou mais cadeias globínicas

- Variantes da Hb - hemoglobinas estruturalmente anómalas

Apesar de ser menos frequente, ambos os fenótipos podem estar associados (presença concomitante de variante estrutural e de redução de síntese) (Sonati & Costa, 2008; Kohne, 2011; Weatherall & Clegg, 2001).

As variantes estruturais da Hb resultam da substituição de um aminoácido numa das cadeias globínicas. Na maioria dos casos são inócuas do ponto visto clínico, mas se afetarem a estabilidade ou a função da molécula de Hb irão provocar patologias. As talassémias são classificadas consoante a cadeia da Hb que é insuficientemente sintetizada (Kohne, 2011)

### 1.6.3.1 Talassémias

A suspeita de talassémia surge após a análise do resultado do hemograma (microcitose/hipocromia). Os portadores heterozigóticos de talassémia, apresentam anemia ligeira, microcítica e hipocrómica. As formas homozigóticas estão associadas a anemia hemolítica hipocrómica (Kohne, 2011).

#### 1.6.3.1.1 $\alpha$ -Talassémias

Os indivíduos com  $\alpha$ -talassémia podem apresentar anemia, VGM e/ou HGM reduzidos associados a um nível de Hb A<sub>2</sub> normal ou ligeiramente diminuído. O fenótipo clínico destas patologias pode variar de assintomático a anemia hemolítica letal (Kohne, 2011; Galanello & Cao, 2011; Harteveld *Et* Higgs, 2010).

O indivíduo normal possui quatro genes alfa, dois em cada um dos cromossomas 16 ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), sendo um cromossoma de origem materna e outro de origem paterna, e o seu genótipo é representado por  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ . Os genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  são homólogos e codificam proteínas idênticas. Apesar dessa homologia, o gene  $\alpha_2$  apresenta uma expressão duas a três vezes superior ao gene  $\alpha_1$ , o que constitui uma condição determinante para o estabelecimento do perfil dos portadores, pois a alteração do gene  $\alpha_2$  tem consequências mais graves ao nível do quadro clínico. Assim, a caracterização da  $\alpha$ -talassémia está relacionada com três fatores: o número de genes afetados, o grau de decréscimo na expressão do gene e a contribuição dos genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  na síntese da globina- $\alpha$ . A nível molecular, resultam de deleções parciais ou totais ou mais raramente de mutações. Na presença de uma mutação que impede a expressão total do cromossoma trata-se de uma  $\alpha^0$ -



talassémia, se a expressão do cromossoma apenas se encontrar reduzida a patologia associada designa-se de  $\alpha^+$ -talassémia (Kohne, 2011; Hartevelde & Higgs, 2010).

O nível de Hb A<sub>2</sub> varia de forma proporcional à diminuição da síntese de cadeias  $\alpha$ -globina. Nas formas moderadas de  $\alpha$ -talassémia, os valores de Hb A<sub>2</sub> são próximos dos valores normais. No entanto, nas formas graves, a diminuição acentuada da produção de  $\alpha$ -globina está associada a uma redução significativa dos níveis de Hb A<sub>2</sub> (Steinberg & Adams, 1991).

As  $\alpha$ -talassémias podem ser classificadas como:

1.  $\alpha$ -Talassémia silenciosa ( $-\alpha/\alpha\alpha$ )

Neste tipo de  $\alpha$ -talassémia, apenas um gene foi afetado e os portadores apresentam características hematológicas normais ou discreta microcitose/hipocromia (Galanello & Cao, 2011).

2. Traço  $\alpha$ -talassémico ( $-\alpha/-\alpha$ ) ou ( $--/\alpha\alpha$ )

Os indivíduos com traço  $\alpha$ -talassémico podem apresentar heterozigotia do tipo  $\alpha^0$ -talassémia ( $--/\alpha\alpha$ ) ou homozigotia do tipo  $\alpha^+$ -talassémia ( $-\alpha/-\alpha$ ). O quadro clínico caracteriza-se pela presença de anemia moderada microcítica e hipocrômica (Galanello & Cao, 2011; Hartevelde & Higgs, 2010).

3. Doença de Hb H ( $--/-\alpha$ )

A deleção de três genes  $\alpha$  tem como consequência o excesso de produção de cadeias  $\beta$ , que formam tetrâmeros  $\beta_4$  (Hb H). A instabilidade da Hb H e a sua facilidade em precipitar dentro dos glóbulos vermelhos, que por sua vez são prematuramente destruídos pelo baço, levam ao aparecimento de hemólise moderada a severa. A doença de Hb H ou  $\alpha$ -talassémia *intermedia*, está associada a anemia microcítica, hemólise, icterícia e esplenomegalia (Galanello & Cao, 2011).

4. Síndrome de hidropsia fetal ( $- -/- -$ )

A subprodução das cadeias  $\alpha$ -globina conduz ao excesso de cadeias  $\gamma$ -globínicas, originando tetrâmeros  $\gamma_4$ , designados de Hb de Bart. A síndrome de hidropsia fetal de Hb de Bart é a forma mais severa de  $\alpha$ -talassémia, pois nenhum dos quatro genes se encontra ativo ( $- -/- -$ ). O feto afetado é incapaz de produzir qualquer cadeia  $\alpha$ -globina que permita a síntese de Hb F ou Hb A. O quadro clínico engloba hepatoesplenomegália acentuada, insuficiência cardíaca, malformações

ao nível do esqueleto e anemia severa. Esta patologia não é compatível com a vida (Galanello & Cao, 2011).

Esta classificação encontra-se esquematicamente representada na Figura 4.

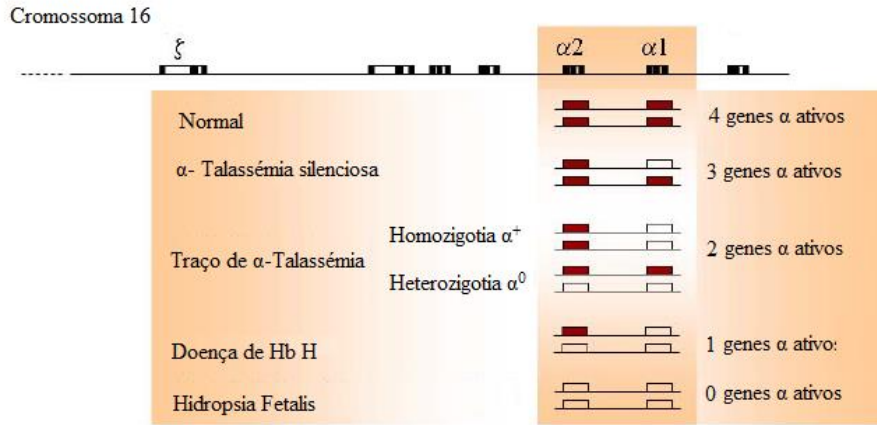


Figura 4: Representação do cromossoma 16 e classificação das  $\alpha$ -talassemia e respetivo fenótipo (Adaptado de Harteveld & Higgs, 2010).

#### 1.6.3.1.2 $\beta$ -talassémias

As  $\beta$ -talassémias resultam de mutações nos genes da  $\beta$  globina que levam à redução ou ausência de síntese das cadeias  $\beta$  globina da Hb. Para além da anemia microcítica hipocrômica, diferentes quadros clínicos podem estar presentes, devido à combinação dos alelos  $\beta^0$  (ausência de expressão) e  $\beta^+$  (redução de expressão) (Kohne, 2011; Sonati & Costa, 2008).

Um nível elevado de Hb A<sub>2</sub> associado a microcitose constitui um forte indicador de presença de  $\beta$ -talassémia (heterozigotia). No entanto, a Hb A<sub>2</sub> pode apresentar valores normais se a  $\beta$ -talassémia coexistir com a  $\delta$  ou  $\alpha$ -talassémia, pois estas levam à diminuição do valor de Hb A<sub>2</sub>.

No caso da  $\beta$ -talassémia homozigótica, a determinação de Hb A<sub>2</sub> não é clinicamente significativa (Steinberg & Adams, 1991).

Estudos epidemiológicos em doentes com  $\beta$ -talassémia, revelaram que níveis elevados de Hb F retardam o aparecimento das manifestações clínicas desta patologia (Bauer *et al.*, 2012).

Clinicamente, as  $\beta$ -talassémias podem ser classificadas como:

- *Major* ou anemia de Cooley: forma homozigótica  $\beta^0\beta^0$  ou dupla heterozigótica  $\beta^0\beta^+$ . Os indivíduos apresentam uma anemia grave e são dependentes de transfusões sanguíneas regulares

- *Intermedia*: homozigotia  $\beta^+\beta^+$  ou dupla heterozigotia  $\beta^0\beta^+$ , abrange os fenótipos clínicos intermédios entre o traço talassémico e a talassémia *major* (Sonati & Costa, 2008)
- *Minor* ou traço talassémico  $\beta$ : heterozigotia das formas  $\beta^0$  ou  $\beta^+$

Na talassémia *major*, os doentes sofrem as consequências diretas da anemia, nomeadamente caquexia, fadiga e insuficiência cardíaca congestiva, e apresentam os efeitos da expansão da eritropoiese extramedular resultante da anemia, como anomalias ósseas, esplenomegalia e atraso no crescimento. A hemólise intensa leva a litíase, formação de úlceras na perna e hipertensão pulmonar. Os doentes com  $\beta$ -talassémia *major* são dependentes de transfusões desde os primeiros meses de vida (Kohne, 2011; Sonati & Costa, 2008).

A talassémia  $\beta$  *intermedia* abrange um vasto leque de fenótipos clínicos associados a uma anemia hemolítica de menor gravidade, com níveis de Hb total de 7 a 9 g/dL, para a qual a terapia transfusional crónica não é normalmente necessária. As complicações trombóticas são mais frequentes nestes doentes do que nos doentes com talassémia *major* (Kohne, 2011).

A talassémia *minor* é uma condição geralmente assintomática, associada a anomalias da morfologia eritrocitária, mas com uma anemia hipocrómica e microcítica ligeira (Kohne, 2011; Sonati & Costa, 2008).

### 1.6.3.2 Variantes da hemoglobina

As Hb variantes resultam de alterações na sequência de aminoácidos das cadeias alfa, beta, delta ou gama da Hb.

Estas patologias podem ser classificadas como (Kohne, 2011):

1. Variantes com tendência a polimerizar e com formação de células falciformes
2. Variantes com síntese anormal de Hb
3. Variantes com tendência a precipitar e presença de hemólise (hemoglobinas instáveis)
4. Variantes com afinidade para o oxigénio alterada - policitémia congénita (aumento da afinidade para o O<sub>2</sub>) ou cianose (diminuição da afinidade para o O<sub>2</sub>)

As principais formas variantes de Hb são: Hb S, Hb C e Hb E. No âmbito deste trabalho apenas será abordada a Hb S, devido à sua maior relevância a nível clínico (Kohne, 2011).

## Hemoglobina S

As síndromes drepanocíticas resultam da presença de uma mutação pontual na cadeia  $\beta$ -globina da molécula de Hb (substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6) o que origina a Hb S.

A Hb S polimeriza em condições de baixa concentração de oxigénio (*stress*, hipoxia ou acidose), dando origem a glóbulos vermelhos em forma de foice e, conseqüentemente, com menor tempo de vida (de 120 dias para 10 a 20 dias) (Manwani & Frenette, 2013; Steinberg, 2008; Kanter & Kruse-Jarres, 2013).

Os indivíduos que herdaram as duas cópias da mutação responsável pela Hb S são homocigóticos para a Hb S (Hb SS) e apresentam uma sintomatologia grave (Kanter & Kruse-Jarres, 2013).

Durante a vida fetal e logo após o nascimento, a baixa expressão do fenótipo Hb SS deve-se ao facto da produção de Hb F ser suficiente para atenuar os efeitos da polimerização da Hb. À medida que os glóbulos vermelhos são libertados pela medula óssea, ocorre o aumento dos níveis de Hb S e a diminuição dos níveis de Hb F. Por consequência, os recém-nascidos apenas irão apresentar sintomatologia clínica após os primeiros seis meses de vida, altura em que os níveis de Hb F atingem valores correspondentes aos da fase adulta (Lervolino *et al.*, 2010).

As manifestações clínicas das síndromes drepanocíticas resultam de dois processos, anemia severa e vaso-oclusão. O quadro anémico deve-se ao menor tempo de vida dos glóbulos vermelhos. A vaso-oclusão, por sua vez, é um processo mais complexo. O efeito intravascular da alteração da estrutura da Hb leva à formação de proteínas em hélice, as quais alteram a permeabilidade da membrana aos iões. A intensidade dos efeitos da vaso oclusão variam, e incluem a isquemia tecidual, crises de dor, doença cerebrovascular, insuficiência renal, pulmonar e cardíaca (Lervolino *et al.*, 2010).

Os doentes sob tratamento apresentam uma esperança média de vida de 50 a 60 anos (Kohne, 2011).

Os indivíduos heterocigóticos ou seja os portadores (Hb AS) apresentam o diagnóstico de traço das células falciformes e não exibem sinais clínicos da doença. Outras síndromes drepanocíticas ocorrem quando as mutações responsáveis por outras formas variantes da Hb (Hb C ou Hb E) ou pela  $\beta$ -talassémia se combinam com a mutação responsável pela Hb S, dando origem aos genótipos Hb SC, Hb SE, Hb S $\beta^+$  e Hb S $\beta^0$  (Kanter & Kruse-Jarres, 2013).

#### **1.6.4 Dados epidemiológicos das hemoglobinopatias**

Aproximadamente 7% da população mundial é portadora de algum tipo de hemoglobinopatia e, sensivelmente, 300 000 a 400 000 bebês nascem todos os anos com formas severas desta doença. Esta patologia é a doença genética mais comum e constitui um dos principais problemas de saúde a nível mundial (Kohne, 2011; Weatherall & Clegg, 2001; Giordano, Hartevelde & Bakker, 2014; Williams & Weatherall, 2012).

Este grupo de patologias apresenta uma maior prevalência na zona do Mediterrâneo e em algumas zonas da Ásia e África. A emigração da população foi um dos principais impulsionadores da dispersão desta doença por outras partes do mundo. Assim, torna-se vital que os governos e instituições de saúde de zonas com elevada prevalência de hemoglobinopatias desenvolvam estratégias para o seu controlo (Kohne, 2011).

O impacto destas patologias nos cuidados de saúde começou, recentemente, a ser avaliado em várias partes do globo. A melhoria das condições de higiene, de nutrição, e do controlo da infeção contribuiu para a diminuição da mortalidade infantil e permitiu que as crianças com formas severas de hemoglobinopatias sobrevivam o tempo suficiente para a determinação do diagnóstico e a realização do tratamento (Weatherall & Clegg, 2001).

##### **1.6.4.1 Distribuição Mundial**

A anemia das células falciformes está amplamente distribuída pela África Subsariana, no Médio Oriente e em algumas partes do subcontinente Indiano, onde a percentagem de portadores varia entre 5 e 40%.

A Hb E está amplamente presente na metade oriental do subcontinente indiano, Bangladesh, Birmânia, leste e sudeste asiático (Williams & Weatherall, 2012; Weatherall & Clegg, 2001).

A talassémia tem uma elevada incidência entre a bacia do Mediterrâneo e parte do continente africano, por todo o Médio Oriente, subcontinente indiano, sudeste asiático e Ilhas do Pacífico.

As formas moderadas de  $\alpha$ -talassémia estão presentes na África Subsariana, no Médio Oriente e subcontinente Indiano. No norte da Índia e na Papua-Nova Guiné, as formas moderadas de  $\alpha$ -talassémia podem atingir 80% da população. As formas mais severas de talassémia ocorrem com menor frequência, apenas se verificando em elevado número no sudeste asiático e em algumas ilhas do Mediterrâneo (Williams & Weatherall, 2012)

Existem mais de 100 mutações diferentes responsáveis pela  $\alpha$ -talassémia e mais de 280 pela  $\beta$ -talassémia. A maioria dos casos de  $\alpha$ -talassémia é devida a deleções que removem parte e/ou todo o gene  $\alpha$ -globina. Neste largo espectro de mutações, algumas são muito frequentes e específicas para algumas populações. A especificidade é explicada pela ocorrência aleatória de uma mutação em particular e a frequência pela vantagem contra a malária nas regiões tropicais e subtropicais devido a uma mutação específica. O reaparecimento da malária em algumas zonas do globo tem um papel importante na manutenção destes polimorfismos. Qualquer alteração resultante da variação na seleção ou na dinâmica da população será muito pequena quando comparada com o efeito da transição demográfica que vários países sofreram nos últimos anos (Harteveld, 2014; Giordano *et al.*, 2014; Weatherall & Clegg, 2001).

#### 1.6.4.2 A realidade em Portugal

No estudo publicado em 1993 sobre a prevalência de hemoglobinopatias na população portuguesa foram avaliadas 15 208 amostras sanguíneas de militares do Exército Português colhidas entre 1983 e 1985. Os resultados demonstraram uma frequência média de portadores de  $\beta$ -talassémia de 0,45% e de Hb S de 0,32%. Este estudo também revelou que os distritos do sul do País apresentavam uma maior prevalência destas patologias (1,57% de  $\beta$ -talassémia em Évora; 1,11% de portadores  $\beta$ -talassémia em Beja) do que na zona norte e

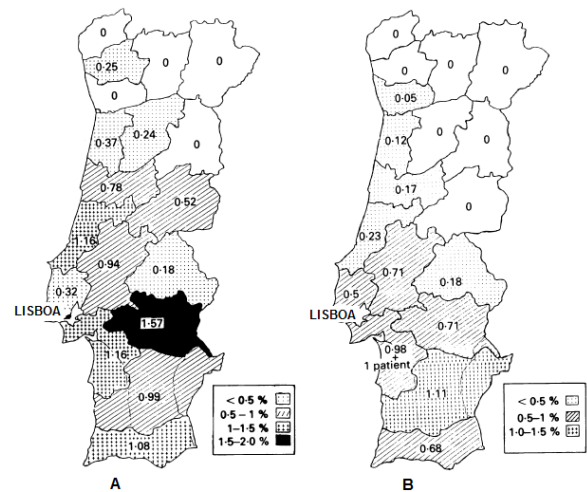


Figura 5: Prevalência de portadores de traço  $\beta$ -talassémico (A) e de traço Hb S (B) em Portugal continental. Adaptado de Martins, 1993.

centro (Figura 5). A migração de escravos africanos para estas zonas para execução de trabalho nos campos de arroz constitui a justificação mais provável para este facto (Martins *et al.*, 1993).

Em 1986, foi criado o Programa Nacional de Controlo das Hemoglobinopatias.

Com o objetivo de identificar as zonas do país com maior prevalência de hemoglobinopatias e de rastrear os casais em risco de ter descendência gravemente afetada, foi realizado um programa de rastreio de portadores nos sete distritos de maior prevalência do centro e sul do País, entre 1987 e 1993. Foram avaliados 22 683 indivíduos, inclusive 6 688 grávidas. Este rastreio permitiu

diagnosticar 7 a 8 vezes mais portadores do que um estudo aleatório. Teve como resultado uma frequência conjunta de portadores de  $\beta$ -talassémia e de Hb S de 8,9%. O rastreio de grávidas permitiu suspeitar da existência de zonas de alta prevalência de portadores de  $\beta$ -talassémia (superior a 5%) na bacia do rio Mira e no Barlavento Algarvio (Inez *et al* 1993).

Em 1996, a Direção-Geral da Saúde publicou a primeira circular normativa dedicada ao Controlo das Hemoglobinopatias, a Circular Normativa (nº5/DSMIA). Em 2004 esta circular foi revogada e substituída pela Circular Normativa nº18/DSMIA.

Em 2011 foi publicado um estudo populacional realizado na Região Centro, onde foi determinado que a prevalência de hemoglobinopatias nesta região foi de 2,2% (Ribeiro, 2011).

No caso das formas graves de talassémia, o fenótipo mais frequente em Portugal é a  $\beta$ -Talassémia *intermedia*, que apresenta genótipos heterogéneos associados a diferentes graus de gravidade. Em geral, está associada a anemia hipocrómica e microcítica moderada (Hb 7-10 g/dL), esplenomegalia e hemossiderose (Ribeiro, 2011).

Num outro estudo, foi realizada uma pesquisa de mutações do gene  $\delta$ -globinico num grupo de 51 cidadãos portugueses portadores de  $\beta$ -talassémia com microcitose, hipocromia e níveis normais ou próximos do limite máximo da normalidade de HbA<sub>2</sub> e num grupo de 15 indivíduos com suspeita de alterações estruturais da  $\delta$ -globina, com o objetivo de identificar o espectro de mutações da  $\delta$ -globina na população portuguesa. Os resultados deste estudo revelaram que a mutação em heterozigotia  $\beta^+$  IVS-I-6T C (HBB:c. 92+6T>C) foi a principal causa para o fenótipo atípico apresentado pelos portadores de  $\beta$ -talassémia com microcitose e hipocromia, mas com níveis de Hb A<sub>2</sub> normais ou *borderline*. Verificou-se também que 8 indivíduos eram duplamente heterozigóticos para uma mutação de  $\beta$ -talassémia e para a mutação  $\delta^+$  Cd27G T (Hb A<sub>2</sub>-Yialousa; HBD:c.82G>T). Um deles também apresentava uma nova mutação no gene que codifica a  $\delta$ -globina, (-80G→A (HBD:c.-130G>A), responsável pela diminuição de aproximadamente 25% da atividade do promotor nos ensaios de expressão transitória. No grupo de 15 indivíduos com suspeita de alterações estruturais de  $\delta$ -globina, foi identificada a presença de variantes conhecidas da Hb A<sub>2</sub>: Hb A<sub>2</sub>' (HBD:c.49G>C), Hb A<sub>2</sub>-Babinga (HBD:c.410G>A) e Hb A<sub>2</sub>-Wrens (HBD:c.295G>A). Foi também identificada uma nova variante, a Hb A<sub>2</sub>-Fogo [ $\delta$ 64 (E8)(Gly→Ser); (HBD:c.193G>A)] (Morgado *et al.*, 2007).

De acordo com os dados publicados pelo DPS-INSA sobre a casuística de hemoglobinopatias diagnosticadas entre 2010 e 2013 nesta instituição, constatou-se que, a maioria dos portadores de hemoglobinopatias identificados, era do sexo feminino (65%), com idade média de diagnóstico

de 29 anos, o que indica uma maior incidência nas mulheres em idade fértil e que os portadores de  $\beta$ -talassémia e de Hb S são os mais frequentes. Embora a prevalência de hemoglobinopatias seja superior nas regiões do Alentejo, Algarve e Lisboa e Vale do Tejo, o diagnóstico de casos na região Norte do País tem vindo a aumentar. Entre 2010 e 2013 foram identificados 9 casais em risco, 7 para drepanocitose e 2 para  $\beta$ -talassémia *major* (Miranda *et al.*, 2013).

### **1.6.5 Métodos de diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias**

A seleção da metodologia e equipamento deve fundamentar-se no volume de trabalho do laboratório, do tipo de amostra, facilidade de manuseamento, reprodutibilidade e custos (Ryan *et al.*, 2010).

#### **1.6.5.1 Colheita da Amostra**

A amostra indicada para a deteção de hemoglobinopatias é o sangue periférico colhido com anticoagulante. Nos recém-nascidos o sangue do cordão umbilical também pode ser utilizado como amostra.

O sangue com anticoagulante é mais estável e permite obter bandas mais visíveis e distintas no gel de eletroforese. As amostras devem ser armazenadas a 4°C e analisadas, preferencialmente, num prazo de uma semana, devendo estar devidamente identificadas com o nome completo do doente, data de nascimento e a sua origem étnica. Informação adicional sobre o histórico familiar e clínico do doente também deve ser disponibilizada na altura da colheita da amostra (Bain, 2006).

#### **1.6.5.2 Testes laboratoriais**

Quando existe suspeita de hemoglobinopatias devem ser realizados testes de rastreio, como o hemograma, a eletroforese/cromatografia ou a focagem isoelétrica. Na presença de policromatofilia deve ser efetuada a contagem de reticulócitos.



### 1.6.5.2.1 Métodos Eletroforéticos

A eletroforese é uma técnica aplicada nos laboratórios para análise qualitativa e quantitativa da Hb. A eletroforese de hemoglobinas consiste na separação das mesmas numa membrana acetato de celulose, num gel de agarose ou de citrato-agar, quando sujeitas a um gradiente elétrico (Brants, 2011; Bain, 2006).

#### Eletroforese em gel a pH alcalino ou ácido

A eletroforese da Hb a pH alcalino (pH 8,4 – 8,6), em membrana de acetato de celulose, é um procedimento simples, rápido e fidedigno. Esta técnica permite a deteção das Hb A, F, S/G/D/Lepore, C/E, H e outras variantes menos comuns. Em meio alcalino, a Hb encontra-se carregada negativamente e irá mover-se em direção ao ânodo. Em cada ensaio deve ser aplicada uma amostra controlo contendo as Hb A, F, S e C. Níveis de Hb F superiores a 2% podem ser identificados visualmente se a metodologia for executada corretamente (Figura 6). A eletroforese semiautomática em gel de agarose é adequada para os laboratórios com baixo a médio volume de trabalho. No entanto, esta técnica é complexa, a nível de procedimento, pois requer preparação manual das amostras. De forma a separar algumas variantes de Hb que, normalmente, migram em conjunto, em condições alcalinas, tais como a Hb C, Hb E e Hb A<sub>2</sub> ou a Hb S, Hb D e Hb G, a amostra também deverá ser analisada em pH ácido (6,0). Em meio ácido, a carga molecular irá diferir e os padrões de migração irão mudar. Assim, a Hb S pode ser distinguida da Hb D, e a Hb C da Hb E (Brants, 2011).

As variantes de Hb, como a Hb S, podem ser quantificadas através da densitometria após a eletroforese/coloração (Ryan *et al.*, 2010).

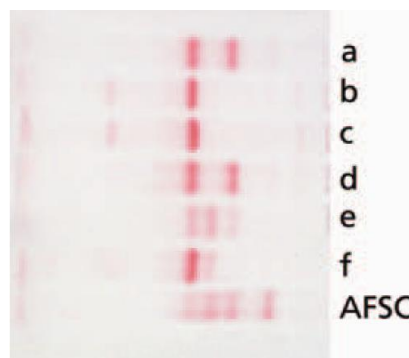


Figura 6: Eletroforese de Hb em membrana de acetato de celulose a pH 8,3:  
a e d – Hb A e Hb S; b e c – Hb A e Hb H; e – Hb A, Hb F e Hb S; f – Hb A e Hb F;  
AFSC – amostra controlo contendo Hb A, Hb F, Hb S e Hb C. adaptado de Bain,

## **Focagem isoelétrica**

Na técnica de focagem isoelétrica (FIE) a carga elétrica da proteína depende do pH do meio: a pH baixo a carga da proteína tende a ser positiva e a pH elevado tende a ser negativa. O pH para o qual a carga elétrica da proteína é nula, é designado de ponto isoelétrico (PI) (Bain, 2006).

Na FIE, as diferentes Hbs são separadas num gel, por exemplo de agarose, de acordo com o seu PI. Quando uma amostra é aplicada no gel sob um forte campo elétrico, as moléculas de Hb migram até atingirem o seu PI. Neste ponto, as bandas correspondentes às diferentes Hb podem ser visualizadas através da coloração e quantificadas por densitometria. A FIE permite uma boa separação da Hb F da Hb A e deteta variantes presentes em baixa concentração, tais como a Hb H, Hb de Bart e variantes da cadeia delta (Bain, 2006; Brants, 2011; Ryan *et al.*, 2010).

Comparativamente à eletroforese, a FIE apresenta as seguintes vantagens: visualização de hemoglobinas que não são separadas por eletroforese e maior nitidez das bandas obtidas (Bain, 2006).

## **Eletroforese capilar**

A eletroforese capilar constitui uma técnica de separação baseada na migração diferencial das moléculas submetidas a um campo elétrico, ao longo de um tubo capilar com menos de 50 µm de diâmetro. Esta técnica tem como grande vantagem o baixo volume de amostra necessário para a sua realização (Bain, 2006).

### **1.6.5.2.2 Cromatografia Líquida de Alta eficiência**

A cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), de troca catiónica, é um processo no qual uma mistura de moléculas com carga elétrica positiva é separada nos seus componentes através da sua adsorção a uma fase estacionária negativamente carregada, presente numa coluna cromatográfica, seguida da sua eluição através de uma fase móvel. A fase móvel é constituída por uma solução com concentração crescente de cátions que atravessam a coluna cromatográfica, e que competem com as proteínas pela ligação aos aniões da coluna cromatográfica. Assim, as moléculas de Hb são eluídas da coluna em função da sua afinidade para a fase estacionária. As Hbs são identificadas de acordo com o seu tempo de

retenção e quantificadas pela determinação da área do pico presente no cromatograma (Bain, 2006).

As Hbs eluídas da coluna são graficamente representadas e automaticamente quantificadas por espectrofotometria (415 nm) (Bain, 2006).

Comparativamente à técnica de eletroforese de hemoglobinas, a técnica de HPLC apresenta as seguintes vantagens: é um analisador automático; usa baixo volume de amostra; permite a quantificação das Hb normais e de variantes em cada amostra; faz identificação provisória de um maior número de Hbs variantes. As desvantagens da HPLC são o seu elevado custo e complexidade (Bain, 2006; Brants, 2011; Ryan *et al.*, 2010).

### 1.6.5.2.3 Teste de solubilidade para a Hb S

O teste de solubilidade da Hb S deve ser realizado sempre que for identificada a presença de Hb S nas técnicas de HPLC ou de eletroforese (Bain, 2006). Este teste baseia-se na insolubilidade relativa da Hb S quando combinada com ditionito de sódio, um agente redutor. Quando o sangue total é adicionado ao ditionito de sódio, ocorre a lise dos glóbulos vermelhos e a libertação da Hb. Se a Hb S estiver presente, a solução irá apresentar turvação, resultado positivo (Figura 7).

Uma solução transparente indica que as hemoglobinas presentes na amostra são solúveis no agente redutor (resultado negativo). Um resultado negativo não indica ausência de Hb S na amostra, pois ela pode estar presente numa percentagem muito baixa. Um controlo negativo e um controlo positivo devem ser sempre realizados em conjunto com a amostra (Bain, 2006; *National Committee for Clinical Laboratory Standards* 1995).

O resultado do teste de solubilidade, quer seja positivo, negativo ou duvidoso, deve ser sempre confirmado com uma técnica alternativa, de forma a confirmar a presença de Hb S, detetar resultados falsos negativos devido a erro da técnica ou devido a uma baixa percentagem de Hb S (Bain, 2006).



Figura 7: Teste de solubilidade para a Hb S- Negativo e Positivo

(adaptado de <http://quizlet.com/18640173/hematology-lecture-16-lmu-flash-cards/>)

#### 1.6.5.2.4 Imunoensaios para variantes de hemoglobina

Atualmente, existem Kits comerciais para a deteção de Hb S, C, E e A. São técnicas muito úteis quando aplicadas corretamente e permitem detetar níveis inferiores a 10% de Hbs variantes (Bain, 2006).

#### 1.6.5.2.5 Deteção de corpos de inclusão Hb H

Os corpos de inclusão de Hb H são precipitados intracelulares de tetrâmeros de  $\beta_4$  presentes nos glóbulos vermelhos. São observáveis em condições onde existe um excesso de cadeias de  $\beta$ -globina, normalmente associado a deficiência de síntese de cadeias de  $\alpha$ -globina.

A deteção de corpos de Hb H é útil na confirmação do diagnóstico da doença de Hb H, na qual inclusões tipo “bolas de golf” são observadas em 5% dos glóbulos vermelhos, após coloração supravital (Ryan *et al.*, 2010).

#### 1.6.5.2.6 Deteção de hemoglobinas instáveis

As hemoglobinas instáveis podem ser detetadas usando o calor ou o isopropanol. Estes testes devem ser executados em paralelo com um controlo positivo (presença de um precipitado) e um controlo negativo (Bain, 2006). Quando a Hb se encontra em meio de isopropanol as ligações entre o grupo heme e as cadeias globina da Hb estão enfraquecidas, logo a estabilidade da Hb é alterada. Assim, se estivermos na presença de uma variante da Hb, a destabilização estrutural causada pelo isopropanol pode ser suficiente para permitir a entrada de água no grupo heme, provocando a precipitação da molécula de Hb. A Hb normal não precipita na presença de isopropanol (Figura 8) (Bain, 2006).

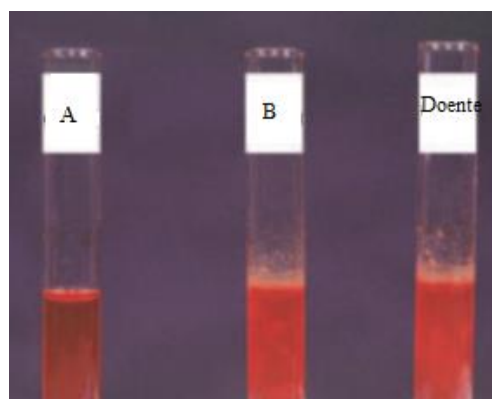


Figura 8: Teste do isopropanol para um Hb instável (Bain, 2006).

A – Controlo negativo; B – Controlo positivo

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Ensaios de controlo de qualidade interno e de avaliação externa em Hemoglobinopatias – UDR/DPS: 2011 – 2014

No âmbito do diagnóstico de hemoglobinopatias, o laboratório da UDR-DPS aplica regularmente amostras de CQI e participa em ensaios de AEQ promovidos pelo PNAEQ e pelo UK-NEQAS.

Foram estudadas amostras controlo de concentração normal (nível de controlo I) e elevada (nível de controlo II) para as hemoglobinas A<sub>2</sub> e F. As amostras controlo com concentração elevada de Hb A<sub>2</sub> e Hb F contêm Hb S e foram por este motivo utilizadas para a determinação da Hb S.

Nos ensaios de CQI foram utilizadas amostras liofilizadas preparadas a partir de sangue humano fornecidas por casas comerciais. Nos ensaios de AEQ foram utilizadas amostras de sangue total e amostras liofilizadas, fornecidas pela instituição organizadora do ensaio.

A metodologia utilizada para a análise das amostras controlo foi a cromatografia por HPLC e os equipamentos avaliados neste estudo foram o Arkray HA-8160 (Menarini) e o Variant II-Beta-tal short program (BioRad).

A análise estatística dos resultados do CQI obtidos entre 2011 e 2014 englobou a determinação da média de concentração de Hb, do desvio padrão (s) e do coeficiente de variação (CV), para todos os equipamentos e por equipamento, bem como por nível de controlo.

O CV foi calculado para cada lote e para cada ano em estudo. O CV anual corresponde à média dos CV dos lotes aplicados no ano em avaliação.

Para finalizar foi realizada uma análise comparativa dos resultados obtidos para cada lote analisado no equipamento Variant II com os valores fornecidos pelos fabricantes.

A análise de resultados dos programas de AEQ envolveu a determinação do erro sistemático (*Bias*), índice de desvio (ID) e erro total (ET).

O *Bias* foi calculado pela diferença entre o valor obtido pelo laboratório e o valor alvo (média de consenso obtida para o método/equipamento) a dividir pelo valor alvo e expresso em percentagem:

$$Bias_{\%} = 100 \times \frac{x - X}{X}$$

Onde x corresponde ao valor obtido pelo laboratório participante e X ao valor alvo.

O ID é utilizado como indicador de desempenho do laboratório participante comparativamente aos outros laboratórios, é fornecido pelo organizador do programa e calculado pela fórmula:

$$ID = \frac{x - X}{s \text{ grupo}}$$

O ET corresponde à associação entre o erro aleatório (CV) e o erro sistemático (*Bias*), ou seja entre o CQI e a AEQ, e foi calculado pela fórmula:

$$ET = ES + z \cdot EA$$

ET = Erro total

ES = Erro sistemático (*Bias*)

EA = Erro aleatório (CV determinado através do CQI)

z = Fator relativo ao nível de confiança desejado (z= 1,65 para 90%)

## **2.2 Ensaios de AEQ enviados pelo PNAEQ no âmbito das hemoglobinopatias: 2011-2014**

Entre 2011 e 2014, o PNAEQ organizou oito ensaios no âmbito das hemoglobinopatias com uma ou duas amostras para identificação e quantificação das frações de Hb (Hb A<sub>2</sub>, Hb F e Hb S), interpretação clínica, e um caso de estudo para interpretação dos resultados.

O estudo apresentado apenas incide sob a análise quantitativa dos resultados obtidos.

Os ensaios incluíram a utilização de amostras liofilizadas comerciais e amostras de sangue total fornecidas pelos laboratórios peritos do grupo de trabalho. O número de laboratórios participantes variou entre 21 e 25 laboratórios (Tabela 5).

As amostras enviadas aos laboratórios participantes podem apresentar níveis de concentração das diferentes Hb dentro dos limites considerados normais ou valores elevados. Na Tabela 6 está representado o número de ensaios de AEQ em que foram analisadas amostras de Hb A<sub>2</sub>, F e S por nível de controlo.

Tabela 5: Caracterização dos ensaios de AEQ realizados entre 2011 e 2014 no âmbito das hemoglobinopatias

Ano	N.º Ensaio	N.º Amostras	Tipo de amostra		Caso clínico	N.º Laboratórios Participantes
			Liofilizada	Sangue total		
2011	1º	1	✓		✓	22
	2º	1	✓		✓	22
2012	1º	1		✓	✓	23
	2º	2	✓	✓	✓	23
2013	1º	2		✓	✓	21
	2º	2	✓	✓	✓	23
2014	1º	2	✓	✓	✓	25
	2º	2	✓	✓	✓	25

Tabela 6: Representação do número de ensaios de AEQ em que foram analisadas amostras de Hb A<sub>2</sub>, F e S, por nível de controlo

Número de ensaios		
Hb	Nível de controlo	
	Normal	Elevado
Hb A <sub>2</sub>	5	3
Hb F	6	7
Hb S		4

: Hb - Hemoglobina

A equipa do PNAEQ é responsável pela aliquotagem, rotulagem e armazenamento das amostras para posterior envio para os laboratórios participantes.

As amostras enviadas são analisadas pelos laboratórios participantes e pelos laboratórios peritos.

Os laboratórios peritos analisam cinco vezes a mesma amostra, com a metodologia de rotina no seu laboratório, para determinação do valor alvo (valor médio).

Cada laboratório preenche o formulário de resposta nas unidades de medida solicitadas no protocolo e envia os seus resultados para o PNAEQ.

Após a receção dos resultados dos laboratórios participantes, estes são introduzidos na aplicação do PNAEQ, o “*AEQ genio*”. Esta aplicação efetua o tratamento estatístico dos resultados com determinação do número de amostras estudadas, da média, da mediana, do desvio padrão, do coeficiente de variação, do valor mínimo e do valor máximo segundo a hierarquia: todas as metodologias, metodologia e equipamento.

Neste trabalho serão apresentados os valores da média, do coeficiente de variação, do valor mínimo e do valor máximo para todas as metodologias e por metodologia.

## **3 Resultados e Discussão**

### **3.1 Controlo de Qualidade Interno em Hemoglobinopatias**

O CQI foi avaliado através da análise do grau de imprecisão analítica ou seja através do cálculo do coeficiente de variação dos resultados obtidos entre 2011 e 2014, para os diferentes tipos de hemoglobinas (A<sub>2</sub>, F e S). Tanto para o nível de concentração normal (I) como elevado (II) foi realizada a determinação do CV por lote e por ano.

#### **3.1.1 Avaliação da quantificação da Hb A<sub>2</sub>**

##### **3.1.1.1 Análise de resultados dos equipamentos HA 8160 e Variant II**

Relativamente à quantificação da Hb A<sub>2</sub>, entre 2011 e 2014, no nível de controlo I, o valor médio de Hb A<sub>2</sub>, por lote, oscilou entre 2,7 e 3,2 % (média de 3,0%) e o CV entre 5,3 e 9,8% (média de 7,2%). No nível de controlo II, o valor médio de Hb A<sub>2</sub> oscilou entre 5,6 e 6,5% (média de 5,9%) e o CV entre 2,7 e 8,7% (média de 4,6%) (Tabela 7).

O número de amostras de controlo do nível I avaliadas por ano variou de 154 a 223 amostras (média de 177 amostras) e o valor de CV entre 5,9 e 8,5% (média de 7,7%). O número de amostras de controlo do nível II avaliadas por ano variou de 118 a 205 amostras (média de 153 amostras) e o valor de CV entre 3,6 e 7,3% (média de 4,5%) (Tabela 7). No nível de controlo I, o valor de CV apresenta uma tendência decrescente, enquanto que no nível de controlo II uma tendência crescente, mantendo-se, no entanto, com valores inferiores ou iguais a 8,5% (Figura 9).

O CV anual corresponde à média dos CVs dos lotes aplicados durante o mesmo ano. A média anual do CV das amostras de controlo de nível I (7,7%) foi superior à média calculada por lote (7,2%), logo pode inferir-se que a variabilidade dos lotes parece ter contribuído para o aumento do CV.

A média de CV do nível de controlo I (7,2%), por lote, foi cerca duas vezes superior à obtida no nível de controlo II (4,6%). Tal deve-se ao facto da concentração de Hb A<sub>2</sub> do nível de controlo I corresponder, aproximadamente, a metade da concentração de Hb A<sub>2</sub> do nível de controlo II.



Tabela 7: Análise estatística dos resultados obtidos entre 2011 e 2014, por lote e ano, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II, na determinação da Hb A<sub>2</sub> em amostras de controlo de nível I e II

<b>Equipamentos HPLC (HA 8160; Variant II) - Quantificação da Hb A<sub>2</sub> (%)</b>								
Nível de Controlo	Ano	Lote				Ano		
		Lote	Média (%)	s	CV (%)	Nº Amostras	CV (%)	
I	2011	34321	2,7	0,2	8,0	172	8,0	
		34351	3,0	0,3	8,5			
	2013	34351	2,9	0,2	6,1	223	5,9	
		34361	3,0	0,2	6,3			
		34381	2,9	0,2	5,3			
		34381	3,0	0,2	6,6			
	2014	34401	3,2	0,3	9,8	154	8,2	
		<b>2011-2014 Média</b>	<b>3,0</b>	<b>0,2</b>	<b>7,2</b>			<b>177</b>
	II	2011	34322	5,6	0,2	3,7	131	3,7
			34352	5,9	0,2	3,6		
2013		34352	5,7	0,2	2,7	205	3,4	
		34362	5,7	0,2	2,8			
		34382	5,9	0,3	4,7			
		34382	6,0	0,3	5,8			
2014		34402	6,5	0,6	8,7	118	7,3	
		<b>2011-2014 Média</b>	<b>5,9</b>	<b>0,3</b>	<b>4,6</b>			<b>153</b>

s – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação

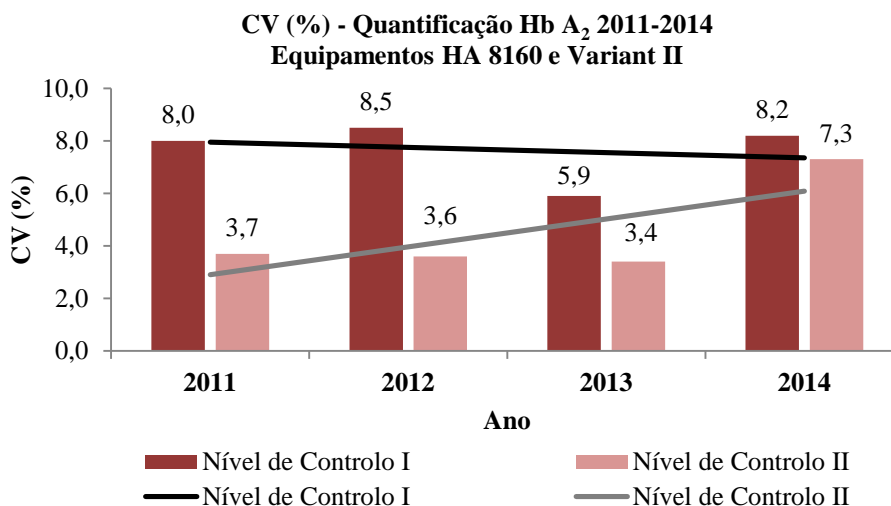


Figura 9: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub>, por ano e nível de controlo, obtidos nos equipamentos HA 8160 e Variant II.

No sentido de compreender a contribuição de cada um dos equipamentos para estes resultados efetuou-se a avaliação de resultados por equipamento.

### 3.1.1.2 Análise de resultados por equipamento de HPLC

#### 3.1.1.2.1 Equipamento HA 8160

No equipamento de HPLC HA 8160, na avaliação por lote, no nível de controlo I, o valor médio de Hb A<sub>2</sub> por lote oscilou entre 2,9 e 3,4% (média de 3,1%) e o CV entre 1,6 e 3,8% (média de 2,5%). No nível de controlo II, o valor médio de Hb A<sub>2</sub> oscilou entre 5,6 e 6,9% (média de 6,1%) e o CV entre 1,2 e 4,4% (média de 2,5%) (Tabela 8 e Figura 10).

A média anual do CV das amostras do controlo de nível I (2,4%) foi ligeiramente inferior à média de CV das amostras controlo de nível II (2,7%) (Tabela 8).

Tabela 8: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> de nível I e nível II, obtidos no equipamento HA 8160, por lote e ano, entre 2011 e 2014.

<b>Equipamento HPLC (HA 8160) - Quantificação da Hb A<sub>2</sub> (%)</b>								
Nível de Controlo	Ano	Lote	Lote			Ano		
			Média (%)	s	CV (%)	Nº Amostras	CV (%)	
I	2011	34321	2,9	0,1	1,9	117	1,9	
	2012	34351	3,3	0,1	3,6	83	3,6	
		34351	3,1	0,1	1,6			
	2013	34361	3,1	0,1	2,0	119	1,8	
		34381	3,0	0,1	2,7			
	2014	34381	3,2	0,1	1,9	68	2,3	
		34401	3,4	0,1	3,8			
	<b>2011-2014 Média</b>			<b>3,1</b>	<b>0,1</b>	<b>2,5</b>	<b>97</b>	<b>2,4</b>
	II	2011	34322	5,6	0,1	2,3	88	2,3
		2012	34352	6,0	0,2	3,3	79	3,3
34352			5,9	0,1	1,2			
2013		34362	5,8	0,1	1,4	106	2,7	
		34382	6,1	0,3	4,4			
2014		34382	6,6	0,2	2,7	47	2,3	
		34402	6,9	0,1	2,0			
<b>2011-2014 Média</b>			<b>6,1</b>	<b>0,2</b>	<b>2,5</b>	<b>80</b>	<b>2,7</b>	

s – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação

No equipamento de HPLC HA 8160, verificou-se, para ambos os níveis de controlo, uma tendência decrescente do valor de CV entre 2011 e 2014, obtendo-se no ano de 2014, em ambos os níveis de controlo, um CV de 2,3% (Figura 10).

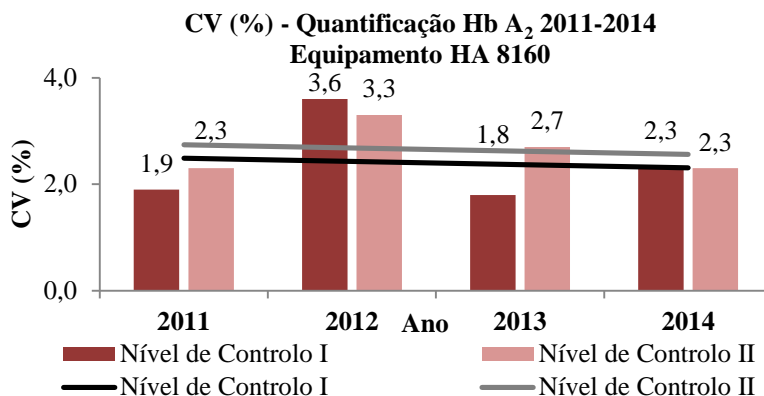


Figura 10: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub>, por ano e nível de controlo, no equipamento HA 8160.

### 3.1.1.2.2 Equipamento Variant II

No equipamento de HPLC Variant II, na avaliação por lote, no nível de controlo I, o valor médio de Hb A<sub>2</sub>, por lote, oscilou entre 2,4 e 2,8% (média de 2,7%) e o CV entre 1,9 e 4,9% (média de 3,3%). No nível de controlo II, o valor médio de Hb A<sub>2</sub> oscilou entre 5,4 e 5,8% (média de 5,7%) e o CV entre 1,5 e 4,0% (média de 2,7%) (Tabela 9 e Figura 11).

A média anual do CV das amostras do controlo de nível I (3,5%) foi ligeiramente superior à média de CV das amostras controlo de nível II (3,1%) (Tabela 9).

Tabela 9: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> de nível I e nível II obtidos no equipamento Variant II por lote e ano, entre 2011 e 2014.

Equipamento HPLC (Variant II) - Quantificação da Hb A <sub>2</sub> (%)							
Nível de Controlo	Ano	Lote	Lote			Ano	
			Média (%)	s	CV (%)	Nº Amostras	CV (%)
I	2011	34321	2,4	0,1	3,6	55	3,6
	2012	34351	2,8	0,1	4,9	74	4,9
	2013	34351	2,7	0,1	1,9	104	1,9
		34361	2,8	0,1	3,4		
		34381	2,7	0,1	2,2		
	2014	34381	2,8	0,1	3,3	67	3,5
		34401	2,8	0,1	3,7		
<b>2011-2014</b>	<b>Média</b>	<b>2,7</b>	<b>0,1</b>	<b>3,3</b>	<b>75</b>	<b>3,5</b>	
II	2011	34322	5,4	0,2	4,0	43	4,0
	2012	34352	5,8	0,2	3,3	77	3,3
	2013	34352	5,6	0,1	1,5	98	2,6
		34362	5,6	0,2	2,9		
		34382	5,7	0,1	2,4		
	2014	34382	5,8	0,1	2,3	72	2,4
		34402	5,8	0,1	2,5		
<b>2011-2014</b>	<b>Média</b>	<b>5,7</b>	<b>0,2</b>	<b>2,7</b>	<b>73</b>	<b>3,1</b>	

s – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação

No equipamento de HPLC Variant II, verificou-se, para os dois níveis de controlo, uma tendência decrescente do valor de CV, o que indica uma melhoria de desempenho deste equipamento ao nível da imprecisão analítica (Figura 11).

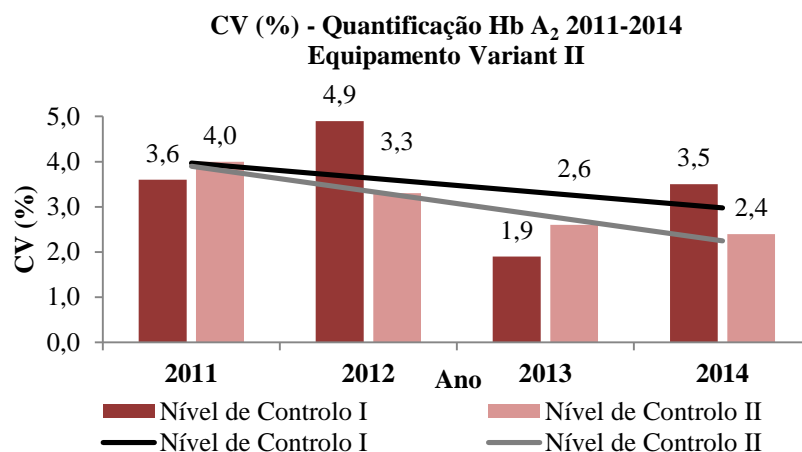


Figura 11: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub>, por ano e nível de controlo, no equipamento Variant II.

Uma vez que o intervalo de concentração de Hb A<sub>2</sub> fornecido pelos fabricantes dos lotes é bastante amplo, é importante que o laboratório estabeleça o seu próprio intervalo para cada lote, de acordo com as suas condições de trabalho, e construa as suas próprias cartas de controlo, de forma a garantir a precisão e reprodutibilidade dos resultados.

Assim, foi realizado, para o equipamento Variant II, um estudo da inexatidão analítica intra-laboratório, utilizando como valor alvo, para cada lote, os valores fornecidos pelo fabricante do controlo para este equipamento (Tabela 10).

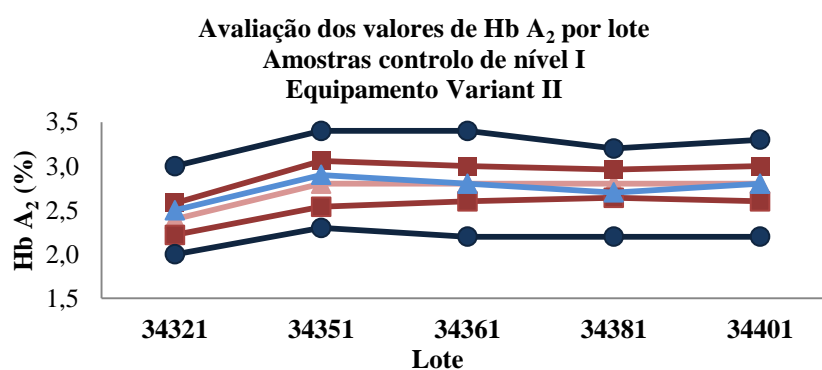
Não se verificaram, para os dois níveis de concentração, diferenças significativas entre as médias dos resultados laboratoriais obtidos e os valores fornecidos pelos fabricantes. O valor de *Bias* variou entre -4,0% e 5,5% (Tabela 10, Figura 12).

Como se pode verificar na Figura 12, os resultados obtidos encontram-se dentro dos intervalos estabelecidos pelos fabricantes dos lotes.

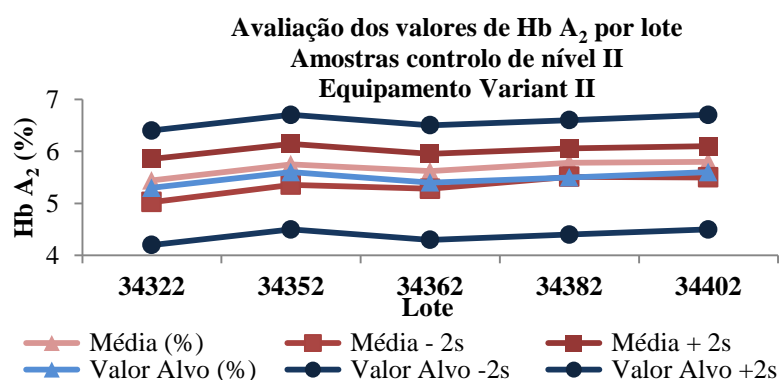
Tabela 10: Análise comparativa dos resultados laboratoriais obtidos nas amostras de controlo para a Hb A<sub>2</sub> com os valores fornecidos pelo fabricante para os diferentes lotes, no equipamento Variant II.

Nível de Controlo	Lote	Resultados laboratoriais				Valores fornecidos pelo fabricante			Diferença resultados	Bias (%)
		Média (%) a	s	a - 2s	a + 2s	Valor Alvo (%) b	b-2s	b+2s	a-b	$\frac{a - b}{b} \times 100$
I	34321	2,4	0,1	2,2	2,6	2,5	2,0	3,0	-0,1	-4,0
	34351	2,8	0,1	2,5	3,1	2,9	2,3	3,4	-0,1	-3,4
	34361	2,8	0,1	2,6	3,0	2,8	2,2	3,4	0,0	0,0
	34381	2,8	0,1	2,6	3,0	2,7	2,2	3,2	0,1	3,7
	34401	2,8	0,1	2,6	3,0	2,8	2,2	3,3	0,0	0,0
II	34322	5,4	0,2	5,0	5,8	5,3	4,2	6,4	0,1	1,9
	34352	5,7	0,2	5,3	6,1	5,6	4,5	6,7	0,1	1,8
	34362	5,6	0,1	5,3	5,9	5,4	4,3	6,5	0,2	3,7
	34382	5,8	0,1	5,5	6,1	5,5	4,4	6,6	0,3	5,5
	34402	5,8	0,2	5,5	6,1	5,6	4,5	6,7	0,2	3,6

s- desvio padrão; a – média; b – valor alvo



A



B

Figura 12: Valor médio dos resultados de Hb A<sub>2</sub>, por lote, de amostras de controlo de nível I (A) e II (B) analisadas no equipamento Variant II, entre 2011 e 2014, em relação ao valor alvo fornecido pelo fabricante e ao valor alvo ± 2s. s- desvio padrão

Pela análise comparativa dos resultados obtidos entre 2011 e 2014 nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II, para ambos os níveis de controlo, verificou-se que:

- O número médio de amostras avaliadas no equipamento HA 8160 (nível I: 97; nível II: 85) foi superior ao determinado no equipamento Variant II (nível I: 75; nível II: 73).
- A concentração média de Hb A<sub>2</sub> foi superior no equipamento HA 8160 (nível I = 3,1%; nível II = 5,9%), comparativamente aos valores obtidos no Variant II (nível I = 2,7 %; nível II = 5,7 %) (Tabela 11).
- Em ambos os equipamentos o CV médio apresentou valores inferiores a 5,0 % (Tabela 11, Figura 13)

Tabela 11: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação correspondentes à quantificação da Hb A<sub>2</sub> entre 2011 e 2014, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.

Ano	Hb A <sub>2</sub> < 3,5%						Hb A <sub>2</sub> ≥ 3,5%						Média CV%	
	Variant II			HA8160			Variant II			HA-8160			Variant II	HA-8160
	N	Média Hb A <sub>2</sub> (%)	CV %	N	Média Hb A <sub>2</sub> (%)	CV %	N	Média Hb A <sub>2</sub> (%)	CV %	N	Média Hb A <sub>2</sub> (%)	CV %		
2011	66	2,4	3,6	117	2,9	1,9	43	5,4	4,0	88	6,6	2,3	3,8	2,1
2012	74	2,8	4,9	83	3,3	3,6	77	5,8	3,3	79	6,0	3,3	4,1	3,5
2013	104	2,8	2,8	119	3,1	2,4	98	5,7	2,3	106	5,5	2,3	2,6	2,4
2014	67	2,8	3,5	68	3,2	2,9	72	5,8	2,4	67	6,8	2,3	3,0	2,6
<b>Média 2011-2014</b>	<b>75</b>	<b>2,7</b>	<b>3,7</b>	<b>97</b>	<b>3,1</b>	<b>2,7</b>	<b>73</b>	<b>5,7</b>	<b>3,0</b>	<b>85</b>	<b>5,9</b>	<b>2,6</b>	<b>3,4</b>	<b>2,6</b>

N – número de amostras; CV – coeficiente de variação

A tendência decrescente do valor de CV, no período de tempo em análise, é indicativo de melhoria ao nível da precisão analítica no equipamento Variant II (Figura 13).

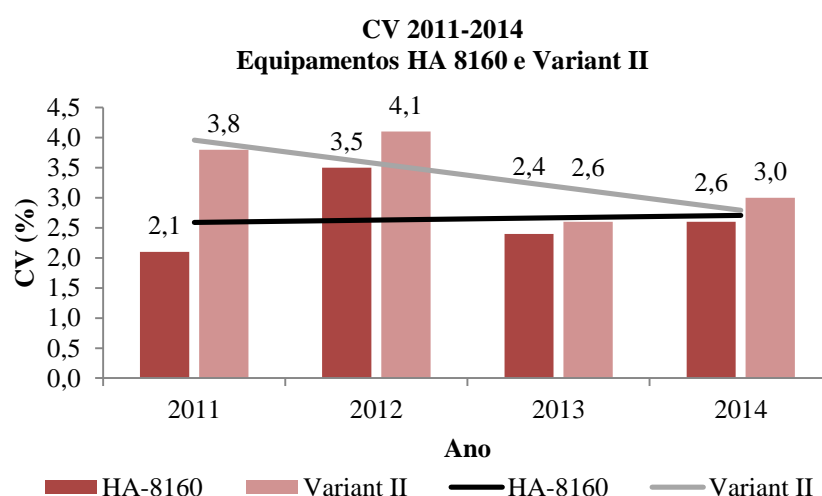


Figura 13: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação (CV) correspondentes à quantificação da Hb A<sub>2</sub>, entre 2011 e 2014, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.

### 3.1.2 Avaliação da quantificação da Hb F

#### 3.1.2.1 Análise de resultados dos equipamentos HA 8160 e Variant II

Relativamente à quantificação da Hb F, entre 2011 e 2014, no nível de controlo I, o valor médio de Hb F, por lote oscilou entre 1,7 e 2,0 % (média de 1,9%) e o CV entre 4,1 e 5,9% (média de 4,9%). No nível de controlo II, o valor médio de Hb F oscilou entre 8,8 e 9,4% (média de 9,2%) e o CV entre 4,4 e 6,6% (média de 5,4) (Tabela 12).

O número de amostras de controlo do nível I, avaliadas por ano, variou de 150 a 204 amostras (média de 176 amostras) e o valor de CV entre 4,6 e 5,9 % (média de 5,1%). O número de amostras de controlo do nível II, avaliadas por ano, variou de 122 a 178 amostras (média de 146 amostras) e o valor de CV entre 4,8 e 6,6% (média de 5,4%) (Tabela 12).

A média de CV, por lote e por ano, do nível de controlo I, respetivamente, 4,9 e 5,1%, foi inferior à obtida para o nível de controlo II, nomeadamente, 5,4 e 5,7%.

Tabela 12: Análise estatística dos resultados obtidos entre 2011 e 2014, por lote e ano, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II, para determinação da Hb F em amostras de controlo de níveis I e II

Equipamentos HPLC (HA 8160; Variant II) - Quantificação da Hb F (%)							
Nível de Controlo	Ano	Lote				Ano	
		Lote	Média (%)	s	CV (%)	Nº Amostras	CV (%)
I	2011	34321	1,7	0,1	5,9	173	5,9
	2012	34351	1,9	0,1	5,0	166	5,0
	2013	34361	1,9	0,1	4,8	204	4,7
		34381	1,9	0,1	4,6		
	2014	34381	2,0	0,1	5,2	150	4,6
		34401	1,8	0,1	4,1		
	<b>2011-2014 Média</b>		<b>1,9</b>	<b>0,1</b>	<b>4,9</b>	<b>176</b>	<b>5,1</b>
II	2011	34322	9,3	0,6	6,6	126	6,6
	2012	34352	9,4	0,6	6,4	159	6,4
	2013	34362	8,9	0,4	4,9	178	5,0
		34382	9,3	0,5	5,1		
	2014	34382	9,4	0,5	5,1	122	4,8
		34402	8,8	0,4	4,4		
	<b>2011-2014 Média</b>		<b>9,2</b>	<b>0,5</b>	<b>5,4</b>	<b>146</b>	<b>5,7</b>

s – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação

No período analisado, observou-se uma tendência decrescente dos valores anuais de CV para os dois níveis de controlo, o que reflete uma melhoria da precisão analítica (Figura 14)

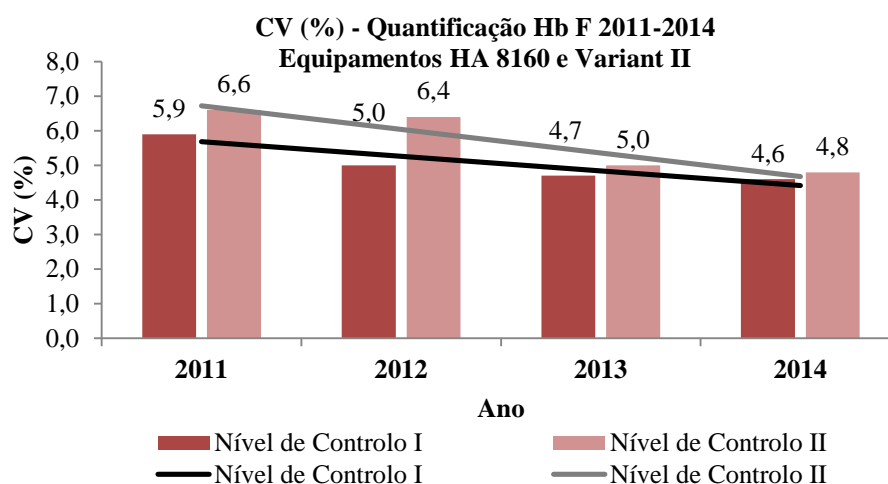


Figura 14: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb F, por ano e nível de controlo, obtidos nos equipamentos HA 8160 e Variant II.

No sentido de compreender a contribuição de cada um dos equipamentos, para estes resultados, efetuou-se a avaliação de resultados por equipamento.

### 3.1.2.2 Análise de resultados por equipamento de HPLC

#### 3.1.2.2.1 Equipamento HA 8160

No equipamento de HPLC HA 8160, na avaliação por lote, no nível de controlo I, o valor médio de Hb F, por lote, oscilou entre 1,6 e 1,9% (média de 1,8%) e o CV entre 2,5 e 4,0% (média de 3,0%). No nível de controlo II, o valor médio de Hb F oscilou entre 8,5 e 9,0% (média de 8,8%) e o CV entre 1,1 e 4,7% (média de 2,2%).

A média anual do CV das amostras do controlo de nível I (2,9%) foi superior à média de CV das amostras controlo de nível II (2,4%) (Tabela 13).



Tabela 13: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb F de nível I e nível II, obtidos no equipamento HA 8160, por lote e ano, entre 2011 e 2014.

Equipamento HPLC (HA 8160) - Quantificação da Hb F (%)							
Nível de Controlo	Ano	Lote	Lote			Ano	
			Média (%)	s	CV (%)	Nº Amostras	CV (%)
I	2011	34321	1,6	0,1	3,0	117	3,0
	2012	34351	1,9	0,1	2,8	84	2,8
	2013	34361	1,9	0,1	3,0	110	2,7
		34381	1,9	0,1	2,5		
	2014	34381	1,9	0,1	2,5	87	3,3
		34401	1,8	0,1	4,0		
	<b>2011-2014 Média</b>		<b>Média</b>	<b>1,8</b>	<b>0,1</b>	<b>3,0</b>	<b>100</b>
II	2011	34322	9,0	0,4	4,7	84	4,7
	2012	34352	8,8	0,1	1,4	78	1,4
	2013	34362	8,6	0,1	1,1	94	2,0
		34382	8,9	0,3	2,9		
	2014	34382	8,7	0,1	1,4	50	1,5
		34402	8,5	0,1	1,6		
	<b>2011-2014 Média</b>		<b>Média</b>	<b>8,8</b>	<b>0,2</b>	<b>2,2</b>	<b>77</b>

s – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação

No equipamento de HPLC HA 8160, verificou-se para o nível de controlo I uma ligeira tendência crescente do valor de CV, atingindo o valor máximo de 3,3% em 2014. No nível de controlo II verificou-se uma tendência decrescente do valor de CV, obtendo-se em 2014 o valor de 1,5% (Figura 15).

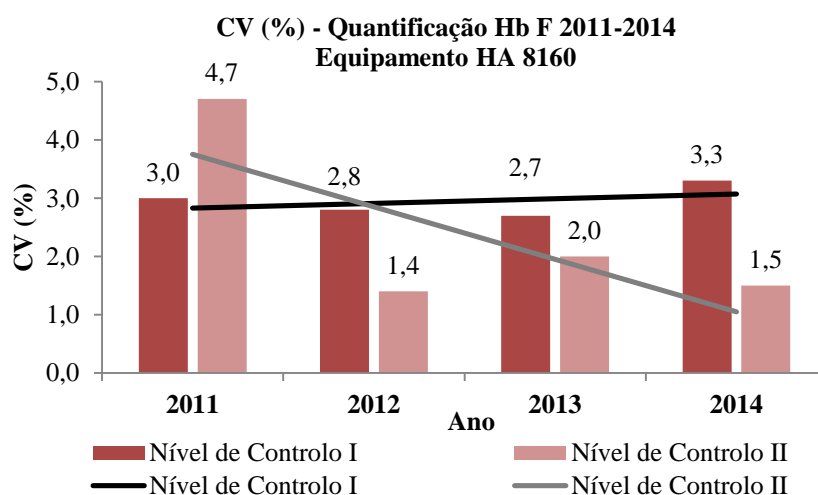


Figura 15: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb F, por ano e nível de controlo, no equipamento HA 8160.

### 3.1.2.2.2 Equipamento Variant II

No equipamento de HPLC Variant II, na avaliação por lote, no nível de controlo I, o valor médio de Hb F oscilou entre 1,8 e 2,1% (média de 1,9%) e o CV entre 2,6 e 4,9% (média de 3,7%). No nível de controlo II, o valor médio de Hb F oscilou entre 9,3 e 10,0% (média de 9,7%) e o CV entre 1,3 e 3,1% (média de 2,5%).

A média anual do CV das amostras do controlo de nível I (3,8%) foi superior à média de CV das amostras controlo de nível II (2,5%) (Tabela 14).

Tabela 14: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb F de nível I e nível II, obtidos no equipamento Variant II, por lote e ano, entre 2011 e 2014.

Equipamento HPLC (Variant II) - Quantificação da Hb F (%)							
Nível de Controlo	Ano	Lote	Lote			Ano	
			Média (%)	s	CV (%)	Nº Amostras	CV (%)
I	2011	34321	1,8	0,1	4,5	56	4,5
	2012	34351	2,1	0,1	3,9	82	3,9
	2013	34361	1,9	0,1	4,9	94	3,8
		34381	2,1	0,1	2,7		
	2014	34381	2,1	0,1	2,6	63	3,1
		34401	1,8	0,1	3,5		
	<b>2011-2014</b>	<b>Média</b>	<b>1,9</b>	<b>0,1</b>	<b>3,7</b>	<b>74</b>	<b>3,8</b>
II	2011	34322	10,0	0,3	2,6	42	2,6
	2012	34352	9,9	0,3	2,8	81	2,8
	2013	34362	9,4	0,2	2,3	84	2,7
		34382	9,7	0,3	3,1		
	2014	34382	9,7	0,3	2,6	72	2,0
		34402	9,3	0,1	1,3		
	<b>2011-2014</b>	<b>Média</b>	<b>9,7</b>	<b>0,3</b>	<b>2,5</b>	<b>70</b>	<b>2,5</b>

s – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação

No equipamento de HPLC Variant II verificou-se uma diminuição do valor de CV entre 2011 e 2014, o que indica uma melhoria de desempenho deste equipamento ao nível da precisão analítica nos dois níveis de controlo (Figura 16).

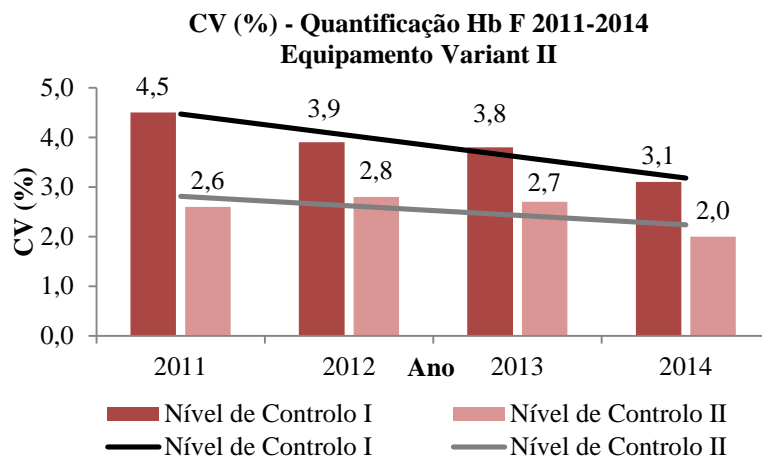


Figura 16: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb F, por ano e nível de controlo, no equipamento Variant II.

Foi realizado, para o equipamento Variant II, um estudo da inexatidão analítica intra-laboratorial, utilizando como valor alvo, para cada lote, os valores fornecidos pelo fabricante do controlo para este equipamento.

Tabela 15: Análise comparativa dos resultados laboratoriais obtidos nas amostras de controlo para a Hb F, com os valores fornecidos pelo fabricante, para os diferentes lotes, no equipamento Variant II

Nível de Controlo	Lote	Resultados laboratoriais				Valores fornecidos pelo fabricante			Diferença resultados	Bias (%)
		Média (%) a	s	a-2s	a+2s	Valor Alvo (%) b	b-2s	b+2s	a-b	$\frac{a - b}{b} \times 100$
I	34321	1,8	0,1	1,6	2,0	1,8	1,4	2,2	0,0	0,00
	34351	2,1	0,1	1,9	2,3	2,1	1,7	2,5	0,0	0,00
	34361	1,9	0,1	1,7	2,1	2,0	1,6	2,4	-0,1	-0,05
	34381	2,1	0,1	1,9	2,3	2,1	1,7	2,5	0,0	0,00
	34401	1,8	0,1	1,6	2,0	1,8	1,4	2,1	0,0	-0,02
II	34322	10,0	0,3	9,4	10,6	9,7	7,8	11,6	0,3	0,03
	34352	9,9	0,3	9,3	10,5	9,6	7,7	11,5	0,3	0,03
	34362	9,4	0,2	9,0	9,8	9,3	7,4	11,2	0,1	0,01
	34382	9,7	0,3	9,1	10,3	9,6	7,7	11,5	0,1	0,01
	34402	9,3	0,1	9,1	9,5	9,8	7,9	11,8	-0,5	-0,05

s- desvio padrão; a – média; b – valor alvo

Não se verificaram, para os dois níveis de concentração, diferenças significativas entre as médias dos resultados laboratoriais obtidos e os valores fornecidos pelos fabricantes. O valor de *Bias* variou entre -0,05% e 0,03% (Tabela 15, Figura 17).

Como se pode verificar na Figura 17, os resultados obtidos encontram-se dentro dos intervalos estabelecidos pelos fabricantes dos lotes.

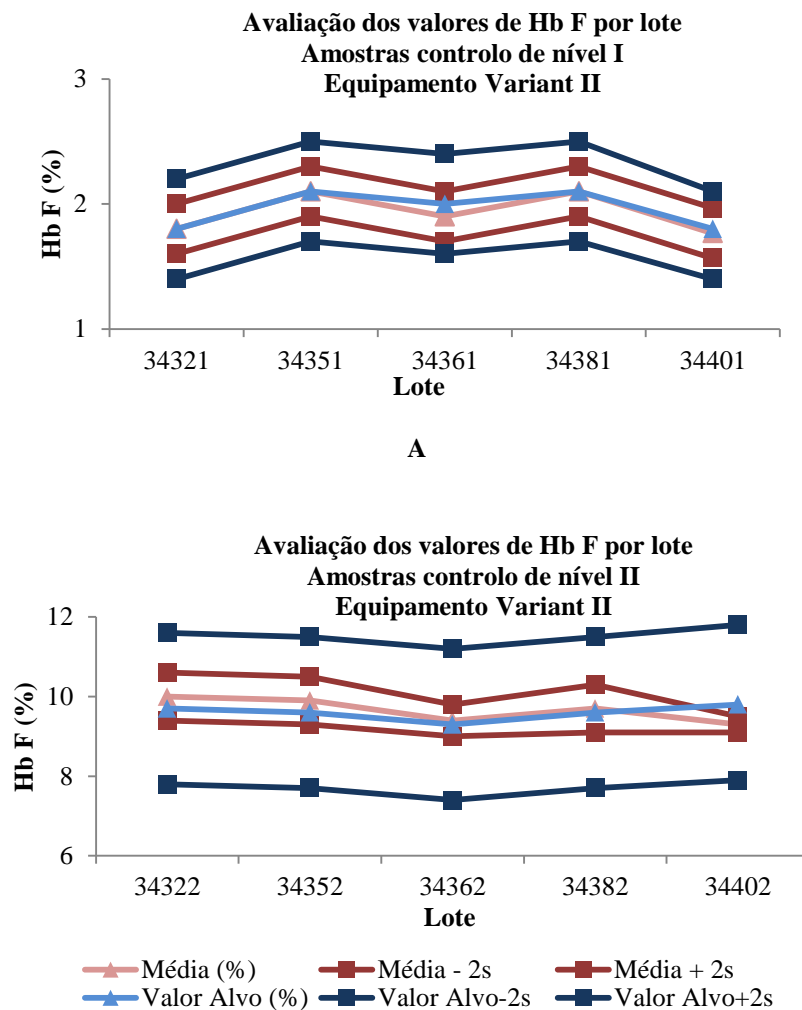


Figura 17: Valor médio dos resultados de Hb F, por lote, de amostras de controlo I (A) e II (B), analisadas no equipamento Variant II, entre 2010 e 2014, em relação ao valor alvo fornecido pelo fabricante e ao valor alvo  $\pm$  2s. s – desvio padrão

Pela análise comparativa dos resultados obtidos entre 2011 e 2014 nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II, verificou-se que

- O número médio de amostras avaliadas no equipamento HA 8160 (nível I: 100; nível II: 77) foi superior ao determinado no equipamento Variant II (nível I: 74; nível II: 70) (Tabela 16).
- No nível de controlo I, a concentração média de Hb F obtida no equipamento HA 8160 (1,8%) foi ligeiramente inferior à determinada no equipamento Variant II (2,0%). No nível de controlo II, a concentração média de Hb F, obtida no equipamento HA 8160 (8,8%), foi inferior à determinada no equipamento Variant II (9,8%) (Tabela 16).

Tabela 16: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação correspondentes à quantificação da Hb F, entre 2011 e 2014, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.

Ano	Hb F < 2,0%						Hb F ≥ 2,0%						Média CV%	
	Variant II			HA8160			Variant II			HA-8160			Variant II	HA-8160
	N	Média Hb F (%)	CV (%)	N	Média Hb F (%)	CV (%)	N	Média Hb F (%)	CV (%)	N	Média Hb F (%)	CV (%)		
2011	56	1,8	4,5	117	1,6	3,0	42	10,0	2,6	84	9,0	4,7	3,6	3,9
2012	82	2,1	3,9	84	1,9	2,8	81	9,9	2,8	78	8,8	1,4	3,4	2,1
2013	94	2,0	3,8	110	1,9	2,7	84	9,6	2,7	94	8,8	2,0	3,3	2,4
2014	63	2,0	3,1	87	1,9	3,3	72	9,6	2,0	50	8,6	1,5	2,6	2,4
<b>Média 2011-2014</b>	<b>74</b>	<b>2,0</b>	<b>3,8</b>	<b>100</b>	<b>1,8</b>	<b>3,0</b>	<b>70</b>	<b>9,8</b>	<b>2,5</b>	<b>77</b>	<b>8,8</b>	<b>2,4</b>	<b>3,2</b>	<b>2,7</b>

N – Número de amostras; CV – Coeficiente de variação; Hb - hemoglobina

- De uma forma global, ambos os equipamentos apresentam uma tendência decrescente do valor de CV o que indica uma melhoria de desempenho ao nível da precisão analítica (Figura 18).

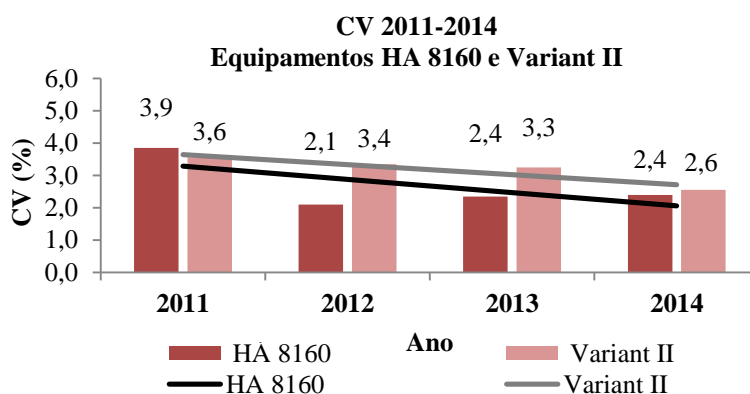


Figura 18: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação (CV) correspondentes à quantificação da Hb F, entre 2011 e 2014, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.

### 3.1.3 Avaliação da quantificação da Hb S

#### 3.1.3.1 Análise de resultados dos equipamentos HA 8160 e Variant II

Entre 2011 e 2014, o valor médio de Hb S, por lote, oscilou entre 27,8 e 29,6% (média de 28,5%) e o CV entre 1,6 e 3,9% (média de 2,3%) (Tabela 17).

O número de amostras avaliadas, por ano, variou de 119 a 215 amostras (média de 156 amostras) e o valor de CV entre 1,6 e 2,6% (média de 2,2%) (Tabela 17 e Figura 19).

A média anual do CV das amostras de controlo (2,2%) foi semelhante à média calculada por lote (2,3%), logo pode-se inferir que a variabilidade dos lotes não contribuiu para o aumento do CV (Tabela 17).

Tabela 17: Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da Hb S em amostras de controlo, entre 2011 e 2014, por lote e ano, nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II.

<b>Equipamento HPLC (HA 8160; Variant II) - Quantificação da Hb S (%)</b>						
<b>Ano</b>	<b>Lote</b>				<b>Ano</b>	
	<b>Lote</b>	<b>Média (%)</b>	<b>s</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Nº Amostras</b>	<b>CV (%)</b>
<b>2011</b>	34322	27,8	0,5	1,6	130	1,6
<b>2012</b>	34352	28,8	0,7	2,6	161	2,6
	34352	28,6	0,5	1,8		
<b>2013</b>	34362	28,4	0,6	2,2	215	2,6
	34382	28,1	1,1	3,9		
<b>2014</b>	34382	28,1	0,6	2,0	119	1,9
	34402	29,6	0,5	1,8		
<b>2011-2014 Média</b>		<b>28,5</b>	<b>0,6</b>	<b>2,3</b>	<b>156</b>	<b>2,2</b>

s – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação

Os valores de CV obtidos do doseamento da Hb S apresentaram uma tendência crescente entre 2011 e 2013 e uma diminuição em 2014, no entanto, os valores mantêm-se inferiores a 3,0% (Figura 19).

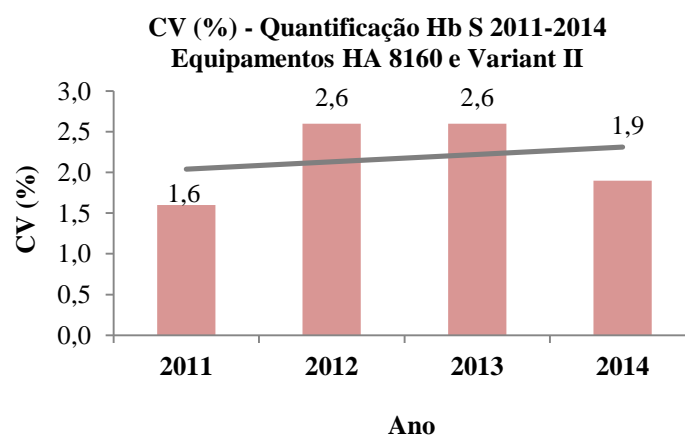


Figura 19: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb S, por ano, obtidos nos equipamentos HA 8160 e Variant II.

### 3.1.3.2 Análise de resultados por equipamento de HPLC

#### 3.1.3.2.1 Equipamento HA 8160

No equipamento de HPLC HA 8160, o valor médio de Hb S, por lote, oscilou entre 27,7 e 29,7% (média de 28,6%) e o CV entre 0,9 e 2,0% (média de 1,5%) (Tabela 18).

Tabela 18: Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da Hb S em amostras de controlo, entre 2011 e 2014, por lote e ano, no equipamento de HPLC HA 8160.

Equipamento HPLC (HA 8160) - Quantificação da Hb S (%)						
Ano	Lote	Lote			Ano	
		Média (%)	s	CV (%)	Nº Amostras	CV (%)
2011	34322	27,7	0,4	1,6	88	1,6
2012	34352	28,9	0,5	1,6	79	1,6
	34352	28,8	0,3	0,9		
2013	34362	28,2	0,3	1,2	111	1,1
	34382	27,9	0,4	1,3		
2014	34382	28,8	0,5	1,6	48	1,8
	34402	29,7	0,6	2,0		
<b>2011-2014</b>	<b>Média</b>	<b>28,6</b>	<b>0,4</b>	<b>1,5</b>	<b>81</b>	<b>1,5</b>

No doseamento da Hb S o valor de CV apresentou, no período em estudo, oscilações ligeiras, mantendo-se inferior a 2,0% (Figura 20).

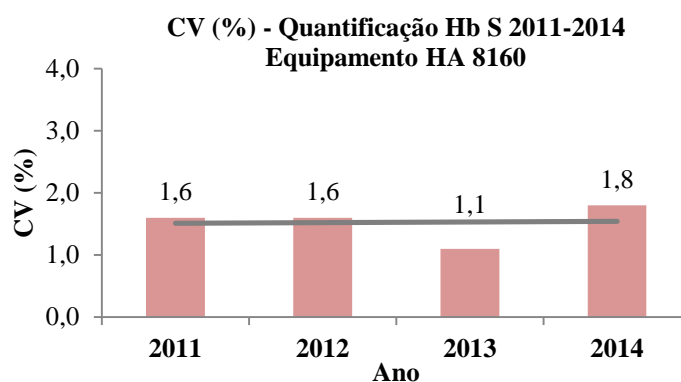


Figura 20: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb S, por ano, obtidos no equipamento HA 8160.

### 3.1.3.2.2 Equipamento Variant II

No equipamento de HPLC Variant II, o valor médio de Hb S por lote, oscilou entre 27,9 e 29,5% (média de 28,5%) e o CV entre 1,1 e 5,3% (média de 2,5%) (Tabela 19).

Tabela 19: Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da Hb S em amostras de controlo, entre 2011 e 2014, por lote e ano, no equipamento de HPLC Variant II.

<b>Equipamento HPLC (Variant II) - Quantificação da Hb S (%)</b>						
<b>Ano</b>	<b>Lote</b>	<b>Lote</b>			<b>Ano</b>	
		<b>Média (%)</b>	<b>s</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Nº Amostras</b>	<b>CV (%)</b>
2011	34322	28,1	0,3	1,1	42	1,1
2012	34352	28,8	0,9	3,3	82	3,3
	34352	28,4	0,6	2,2		
2013	34362	28,6	0,8	2,9	104	3,5
	34382	28,3	1,5	5,3		
2014	34382	27,9	0,4	1,3	71	1,3
	34402	29,5	0,4	1,4		
<b>2011-2014</b>	<b>Média</b>	<b>28,5</b>	<b>0,7</b>	<b>2,5</b>	<b>75</b>	<b>2,3</b>

s – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação

No equipamento estudado, o valor de CV sofre um aumento entre 2011 e 2012 e decréscimo significativo em 2014, atingido o valor de 1,3% (Figura 21).

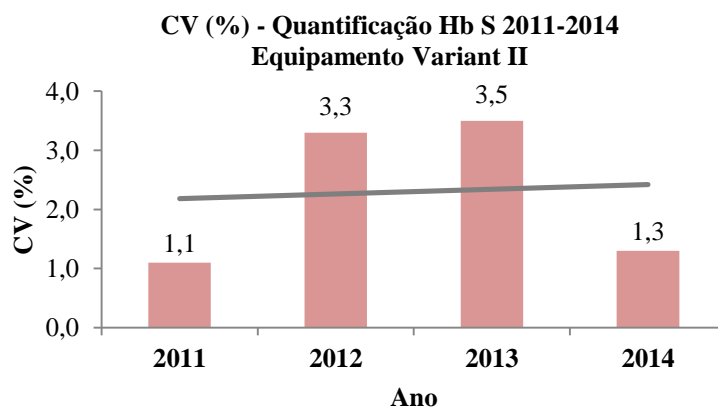


Figura 21: Análise dos CV dos resultados das amostras de controlo de Hb S por ano, obtidos no equipamento Variant II.



Através da análise comparativa dos CV obtidos nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II, verificou-se que para o doseamento da Hb S:

- O número médio de amostras avaliadas por ano no equipamento HA 8160 (81) foi superior ao número de amostras avaliadas no equipamento Variant II (75) (Tabela 20).
- A concentração média de Hb S no equipamento HA 8160 (28,5%) foi semelhante à determinada no Variant II (28,4%).
- O valor médio de CV obtido no equipamento HA 8160, por lote e por ano, foi inferior ao determinado no equipamento Variant II.
- Ambos os equipamentos apresentaram, para o doseamento da Hb S, uma tendência crescente do valor de CV, no entanto, entre 2011 e 2013 foram inferiores a 2,0% e em 2014 inferiores a 3,0% (Tabela 20 e Figura 22).

Tabela 20: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação correspondentes à quantificação da Hb S entre 2011 e 2014, nos equipamentos HA 8160 e Variant II.

Ano	Hb S					
	Variant II			HA 8160		
	N	Média Hb S (%)	CV (%)	N	Média Hb S (%)	CV (%)
2011	42	28,1	1,1	84	27,7	1,6
2012	82	28,8	3,3	79	28,9	1,6
2013	104	28,3	3,5	111	28,2	1,1
2014	71	28,4	1,3	48	29,3	1,8
<b>Média</b>	<b>75</b>	<b>28,4</b>	<b>2,3</b>	<b>81</b>	<b>28,5</b>	<b>1,5</b>

N – número de amostras; CV – coeficiente de variação

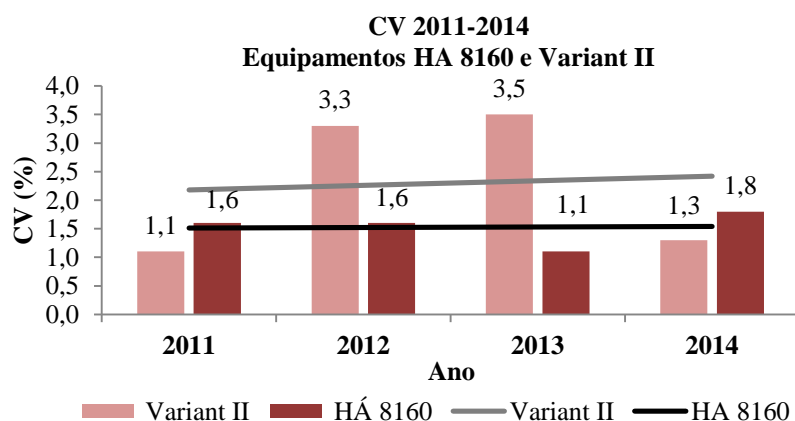


Figura 22: Análise comparativa dos valores de coeficiente de variação (CV) correspondentes à quantificação da Hb S, entre 2011 e 2014, nos equipamentos HA 8160 e Variant II.

## 3.2 Avaliação Externa da Qualidade em Hemoglobinopatias

Tal como foi referido na parte introdutória deste trabalho, a inexatidão analítica avalia o desempenho analítico do laboratório comparativamente a outros laboratórios ou padrões de referência. O grau de inexatidão analítica é avaliado através da determinação do erro sistemático (*Bias*) e do índice de desvio (ID). Neste sentido, a participação do laboratório da UDR em programas de AEQ, promovidos pelo PNAEQ e UK-NEQAS, foi avaliada através da análise dos valores de *Bias* e de ID, determinados entre 2011 e 2014, relativos à quantificação das Hb A<sub>2</sub> e Hb S utilizando a metodologia de HPLC (equipamentos HA 8160 e Variant II). Relativamente à Hb F apenas foi analisado o *Bias*, uma vez que o ID não foi disponibilizado nos relatórios de desempenho dos programas de AEQ.

### 3.2.1 Avaliação da inexatidão analítica da quantificação da hemoglobina A<sub>2</sub> por equipamento de HPLC (HA 8160 e Variant II)

#### 3.2.1.1 *Bias* e Índice de Desvio

Na Tabela 21 estão indicados os valores de *Bias* resultantes da participação do laboratório da UDR em programas de AEQ, para o doseamento da Hb A<sub>2</sub>, promovidos pelo PNAEQ e UK-NEQAS entre 2011 e 2014.

O valor médio de *Bias*, para a quantificação de Hb A<sub>2</sub> com concentração < a 3,5%, no equipamento de HPLC HA 8160 variou de -2,1 a 5,5%, e para o equipamento Variant II de -1,3 a 3,1%. Nas amostras com concentração ≥ a 3,5%, o valor de médio de *Bias* variou de -8,2 a 1,2% para o equipamento de HPLC HA 8160, e de -2,7 a 0,3% para o equipamento Variant II (Tabela 21).

Na Tabela 22 estão presentes os valores anuais de *Bias* para cada equipamento, independentemente do nível de controlo.

Tabela 21: Valor médio de *Bias*, em cada equipamento, por concentração de Hb A<sub>2</sub> e por ano.

Concentração de Hb A <sub>2</sub>	Ano	N.º Ensaios AEQ			Média <i>Bias</i> HA 8160 (%)			Média <i>Bias</i> Variant II (%)		
		PNAEQ	UK-NEQAS	Total	PNAEQ	UK-NEQAS	PNAEQ e UK-NEQAS	PNAEQ	UK-NEQAS	PNAEQ e UK-NEQAS
< 3,5%	2011	1	7	8	0,7	3,7	3,3	-10,7	0,0	-1,3
	2012	1	10	11	-1,0	6,1	5,5	-2,3	3,3	2,8
	2013	2	8	10	-8,0	-0,6	-2,1	-6,2	5,5	3,1
	2014	1	7	8	0,3	5,7	5,1	-3,6	0,5	0,2
	<b>Média</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>-2,0</b>	<b>3,7</b>	<b>3,0</b>	<b>-5,7</b>	<b>2,3</b>	<b>1,2</b>
> 3,5%	2011	1	1	2	-9,1	0,0	-4,6	-2,3	2,9	0,3
	2012		1	1		-2,4	-2,4		0,0	0,0
	2013	1	2	3	-12,6	-6,1	-8,2	-3,4	-2,4	-2,7
	2014	1	2	3		1,2	1,2	-2,0	-3,8	-2,4
	<b>Média</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>-10,9</b>	<b>-1,8</b>	<b>-3,5</b>	<b>-2,6</b>	<b>-0,8</b>	<b>-1,2</b>

PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade; UK-NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

Tabela 22: Valor médio de *Bias* em cada equipamento, por ano.

Ano	Média <i>Bias</i> Equipamento (%)	
	HA 8160	Variant II
<b>2011</b>	1,8	-1,0
<b>2012</b>	4,8	2,6
<b>2013</b>	2,5	1,8
<b>2014</b>	4,3	-0,3
<b>Média 2011-2014</b>	<b>3,4</b>	<b>0,8</b>

O *Bias* retrata a proximidade do valor obtido pelo laboratório e o valor alvo: quanto menor for o seu valor, mais próximo do valor alvo se encontra o valor obtido pelo laboratório.

No ano de 2011, o equipamento Variant II apresenta um valor de *Bias* negativo, ou seja, o valor de Hb A<sub>2</sub> determinado pelo laboratório foi inferior ao valor alvo. O equipamento HA 8160 apresenta um *Bias* positivo, o que significa que o valor de Hb A<sub>2</sub> determinado neste equipamento foi superior ao valor alvo. No ano de 2012 foram obtidos valores positivos em ambos os equipamentos, tendo o equipamento Variant II apresentado o menor valor. Em 2013 e em 2014, os valores de *Bias* indicam que o valor médio de Hb A<sub>2</sub> obtido no equipamento HA 8160 foi superior ao valor alvo. No equipamento Variant II, aquele valor foi superior no ano de 2013 e inferior no ano de 2014. Uma vez que o equipamento Variant II apresenta valores de *Bias* mais próximos do valor nulo do que o equipamento HA 8160, tal sugere que este equipamento será mais indicado para o doseamento da Hb A<sub>2</sub> (Figura 23).

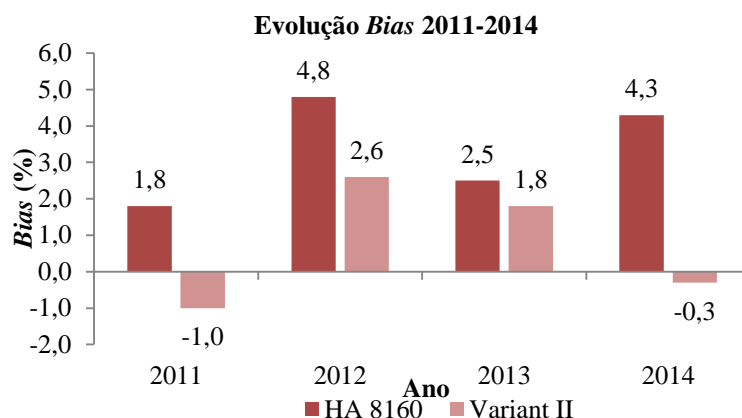


Figura 23: Representação da evolução do valor de *Bias* obtido na quantificação da Hb A<sub>2</sub>, por equipamento e entidade responsável, por programas de AEQ.

Relativamente à avaliação dos ID, de acordo com a classificação apresentada anteriormente (tabela 3) e com os resultados apresentados na Tabela 23, a classificação do laboratório foi considerada como satisfatória em todos os ensaios.

Tabela 23: Valores de índice de desvio entre 2011 e 2014 obtidos na quantificação da Hb A<sub>2</sub> no equipamento HA 8160.

Ano	Concentração de Hb A <sub>2</sub>				Média ID	
	< 3,5%		≥3,5%			
	PNAEQ	UK-NEQAS	PNAEQ	UK-NEQAS	PNAEQ	UK-NEQAS
2011		0,3		-0,6		0,2
2012	-0,2	0,8		0,3	-0,2	0,7
2013	-0,9	0,1	-0,9	-1,1	-0,9	-0,3
2014	-0,3	0,2	-0,5	-0,4	-0,4	0,2

ID – índice de desvio; PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade; UK-NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*.

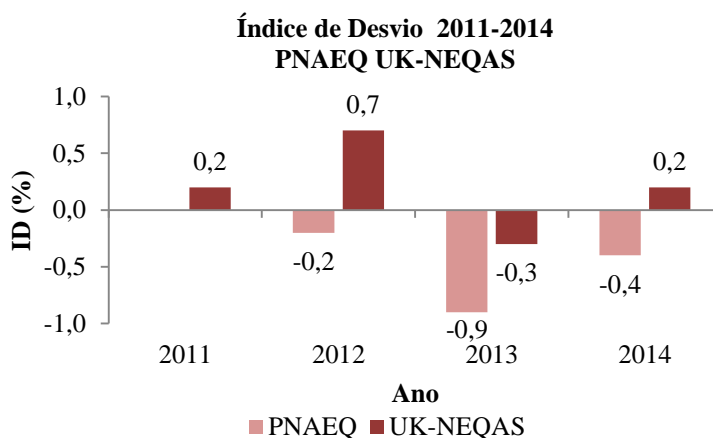


Figura 24: Índice de desvio, entre 2011 e 2014, na quantificação da Hb A<sub>2</sub> no equipamento HA 8160.

### 3.2.2 Erro total da quantificação da Hb A<sub>2</sub>

O erro total foi determinado para os dois equipamentos, por nível de concentração de amostra de Hb A<sub>2</sub> e ano em estudo.

Para níveis de concentração de Hb A<sub>2</sub> < 3,5 %, o valor de ET correspondente ao equipamento Variant II variou de 6,0 a 10,9%, enquanto que no equipamento HA 8160 de 6,1 a 11,4%. Para níveis de concentração de Hb A<sub>2</sub> ≥ 3,5%, o valor de ET no equipamento Variant II oscilou entre 5,4 e 6,9% e no equipamento HA 8160 de 5,0 a 12,0% (Tabela 24).

Tabela 24: Erro total para a quantificação de amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> por equipamento, entre 2011 e 2014.

Ano	Hb A <sub>2</sub> <3,5%						Hb A <sub>2</sub> ≥ 3,5%						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	1,3	3,6	7,2	3,3	1,9	6,4	0,3	4,0	6,9	4,6	2,3	8,4	1,0	3,8	7,3	1,8	2,1	5,3
2012	2,8	4,9	10,9	5,5	3,6	11,4	0,0	3,3	5,4	2,4	3,3	7,8	2,6	4,1	9,4	4,8	3,5	10,5
2013	3,1	2,8	7,7	2,1	2,4	6,1	2,7	2,3	6,5	8,2	2,3	12,0	1,8	2,6	6,0	2,5	2,4	6,4
2014	0,2	3,5	6,0	5,1	2,9	9,9	2,4	2,4	6,4	1,2	2,3	5,0	0,3	3,0	5,2	4,3	2,6	8,6

CV – Coeficiente de variação; ET – erro total

Como se pode verificar na Figura 25-A, para níveis de concentração de Hb A<sub>2</sub> < 3,5 %, o valor de ET apresenta uma tendência crescente para o equipamento HA 8160 e decrescente para o equipamento Variant II. Ambos os equipamentos apresentam uma tendência decrescente do valor de ET para níveis de concentração de Hb A<sub>2</sub> ≥ 3,5%, (Figura 25-B).

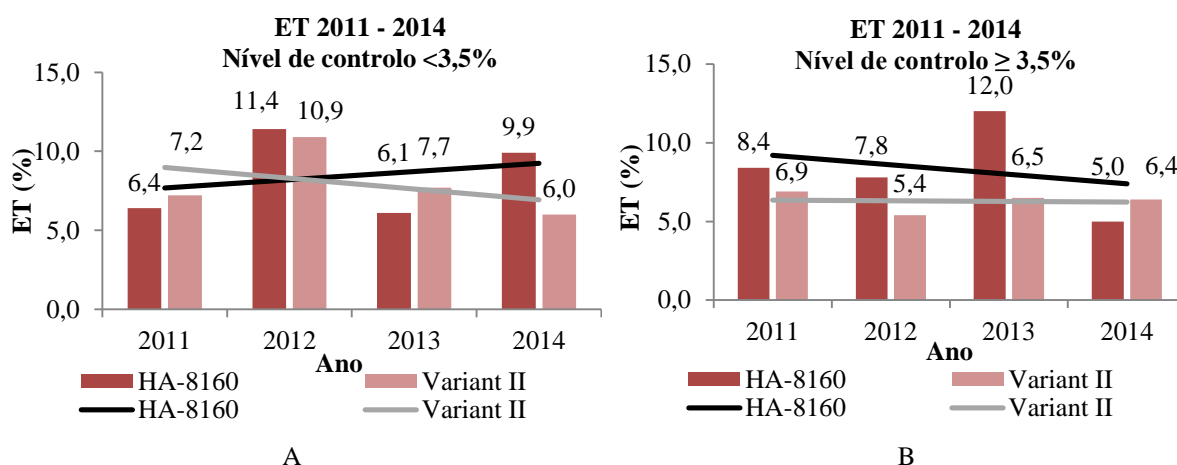


Figura 25: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> com concentração Hb A<sub>2</sub> <3,5% (A) e concentração Hb A<sub>2</sub> ≥3,5% (B) entre 2011 e 2014, nos equipamentos Variant II e HA 8160.

De acordo com a bibliografia consultada, foi estabelecido, como valor limite de ET o valor de 9,0% (Mosca *et al.*, 2013).

A média anual do ET, para ambos os equipamentos, atingiu em 2012 valores superiores a 9,0%. Entre 2012 e 2014, o valor de ET, associado ao equipamento Variant II apresenta, uma diminuição constante, atingindo o valor mínimo de 5,2% em 2014. O equipamento HA 8160 apresenta uma diminuição do valor de ET em 2013 e uma nova subida em 2014, no entanto, não atinge o valor de 9,0%. Como se pode verificar pela Figura 26, apenas o equipamento Variant II apresenta uma tendência decrescente do valor de ET no período em análise.

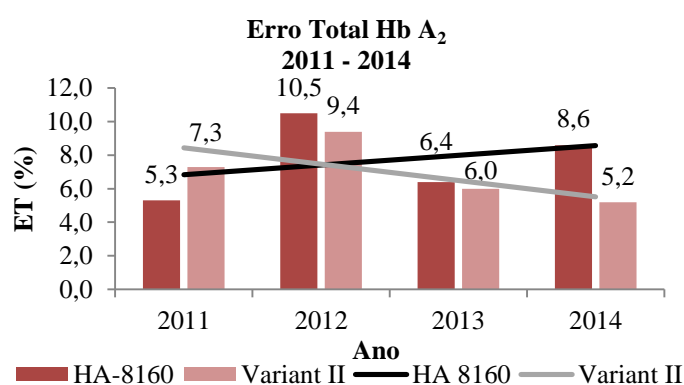


Figura 26: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> nos equipamentos Variant II e HA 8160, entre 2011 e 2014.

### 3.2.3 Avaliação da inexatidão analítica da quantificação da hemoglobina F por metodologia de HPLC (HA 8160 e Variant II)

#### 3.2.3.1 Bias

Na Tabela 25 estão indicados os valores de *Bias* resultantes da participação do laboratório em programas de AEQ promovidos pelo PNAEQ e UK-NEQAS entre 2011 e 2014.

No equipamento de HPLC HA 8160, o valor médio de *Bias* para a quantificação de Hb F com concentração < a 2,0% variou de -25,8 a 3,8 % e para o equipamento Variant II o valor médio de *Bias* variou de -17,0 a 0,9%. Nas amostras com concentração ≥ a 2,0%, para o equipamento de HPLC HA 8160, o valor de *Bias* variou de -9,2 a -3,4% e para o equipamento Variant II o valor de *Bias* variou de -2,8 a 2,1% (Tabela 25).

Tabela 25: Valor médio de *Bias* em cada equipamento por concentração de Hb F e por ano.

Concentração de Hb F	Ano	N.º Ensaios AEQ			Média <i>Bias</i> HA 8160 (%)			Média <i>Bias</i> Variant II (%)		
		PNAEQ	UK-NEQAS	Total	PNAEQ	UK-NEQAS	PNAEQ e UK-NEQAS	PNAEQ	UK-NEQAS	PNAEQ e UK-NEQAS
< 2,0%	2011	1	12	13	0,5	4,0	3,8	2,9	-3,7	-3,2
	2012	1	6	7	-26,5	-20,6	-21,1	-57,1	-2,3	-6,8
	2013	2	6	8	-18,3	-27,8	-25,8	-25,8	-18,4	-17,0
	2014	2	6	8	28,2	-10,7	-6,8	-6,8	-0,2	0,9
	<b>Média</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>-4,0</b>	<b>-13,8</b>	<b>-12,5</b>	<b>-21,7</b>	<b>-6,2</b>	<b>-6,5</b>
≥ 2,0%	2011	1	3	4	-7,1	-4,8	-5,4	-5,4	4,5	1,6
	2012	2	5	7	-1,3	-9,7	-7,8	-7,8	-1,6	-2,8
	2013		3	3		-9,2	-9,2	-9,2	0,6	0,6
	2014	1	4	5	18,3	-3,4	-3,4	1,0	0,0	2,1
	<b>Média</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3,3</b>	<b>-6,8</b>	<b>-6,5</b>	<b>-5,4</b>	<b>0,9</b>	<b>0,4</b>

PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade; UK-NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

Em 2011, o valor de *Bias* foi positivo para o equipamento HA 8160 e negativo para o Variant II, ou seja, o valor médio de Hb F determinado no primeiro equipamento foi superior ao valor alvo e inferior para o segundo equipamento. Entre 2012 e 2013, ambos os equipamentos apresentam valores de *Bias* negativos. No ano 2014 apenas se verificou esta situação para o equipamento HA 8160. Uma vez que o equipamento Variant II apresenta valores de *Bias* mais próximos do valor nulo do que o equipamento HA 8160, tal sugere que este equipamento será mais indicado para o doseamento da Hb F (Tabelas 25 e 26, Figura 27).

Tabela 26: Valor médio de *Bias* em cada equipamento, por ano.

Ano	Média <i>Bias</i> Equipamento (%)	
	HA 8160	Variant II
2011	1,6	-2,1
2012	-15,4	-2,1
2013	-23,5	-14,6
2014	-4,2	1,2

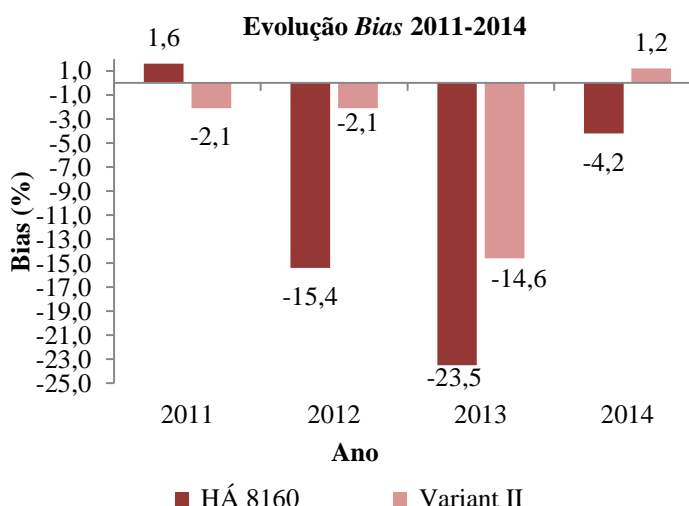


Figura 27: Representação da evolução do valor de *Bias* obtidos na quantificação da Hb F, por equipamento e entidade responsável por programas de AEQ.

### 3.2.4 Erro total da quantificação da Hb F

O erro total foi determinado para os dois equipamentos, por nível de concentração de amostra de Hb F e ano em estudo (Tabela 27).

Para níveis de concentração de Hb F < 2,0%, o valor de ET correspondente ao equipamento Variant II variou de 6,0 a 23,3%, enquanto que no equipamento HA 8160 variou de 8,8 a 30,3%. Para níveis de concentração de Hb F ≥ 2,0%, o valor de ET no equipamento Variant II oscilou entre 5,1 e 7,4% e no equipamento HA 8160 de 5,9 a 13,2% (Tabela 27).

Tabela 27: Erro total para a quantificação de amostras de controlo de Hb F, por equipamento, entre 2011 e 2014.

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

CV – coeficiente de variação; ET – Erro total

Como se pode verificar na Figura 28-A, para níveis de concentração de Hb F < 2,0%, o valor de ET apresentou uma tendência crescente para o equipamento HA 8160 e decrescente para o equipamento Variant II. Ambos os equipamentos apresentam uma tendência decrescente do valor de ET para níveis de concentração de Hb F ≥ 2,0%, (Figura 28-B).

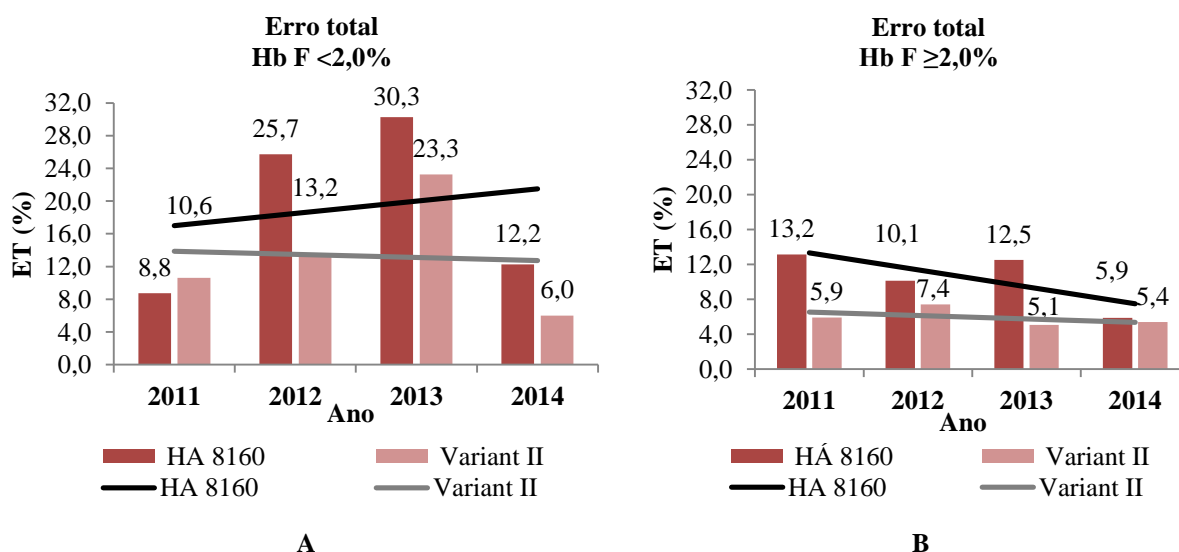


Figura 28: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb F com concentração Hb F < 2,0% (A) e concentração Hb F ≥ 2,0% (B), entre 2011 e 2014.



As médias anuais do ET apresentam valores superiores a 9,0% em 2012 para o equipamento HA 8160 e em 2013 para ambos os equipamentos.

Em 2014 obteve-se o menor valor de ET para o equipamento Variant II (5,4%).

Em ambos os equipamentos se verificou uma tendência crescente do valor de ET, sendo mais significativa no equipamento HA 8160 (Figura 29).

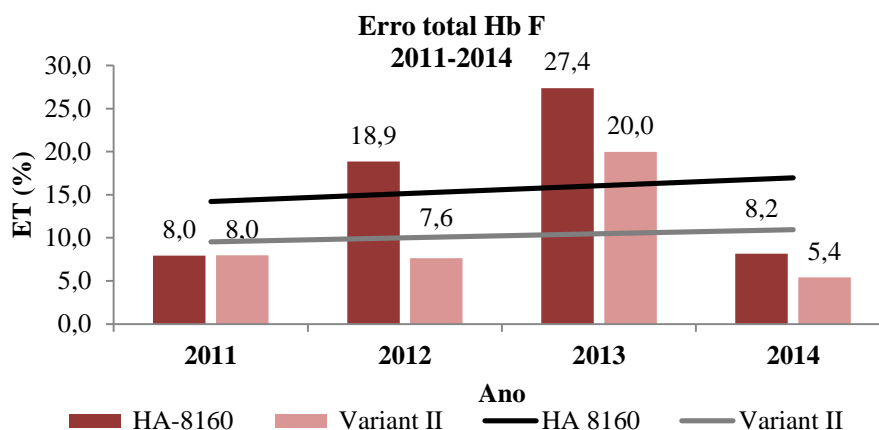


Figura 29: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb F nos equipamentos Variant II e HA 8160, entre 2011 e 2014.

### 3.2.5 Avaliação da inexatidão analítica da quantificação da hemoglobina S por equipamento de HPLC (HA 8160 e Variant II)

#### 3.2.5.1 Bias e Índice de Desvio

Na Tabela 28 estão indicados os valores de *Bias* resultantes da participação do laboratório em programas de AEQ promovidos pelo PNAEQ e UK-NEQAS, entre 2011 e 2014, para a Hb S. No equipamento de HPLC HA 8160, o valor médio de *Bias* variou de -11,7 a -0,4 % e para o equipamento Variant II o valor médio de *Bias* variou de -2,1 a -0,6%.

Entre 2011 e 2014, ambos os equipamentos apresentam valores de *Bias* negativos, ou seja, o valor de Hb S determinado pelo laboratório foi inferior ao valor alvo. Uma vez que o equipamento Variant II apresenta valores de *Bias* mais próximos do valor nulo do que o equipamento HA 8160, pode-se inferir que este equipamento será mais indicado para o doseamento da Hb A<sub>2</sub> (Figura 30).

Tabela 28: Valor médio de *Bias* em cada equipamento por ano na determinação de Hb S.

Ano	N.º Ensaios AEQ			Média <i>Bias</i> HA 8160 (%)			Média <i>Bias</i> Variant II (%)		
	PNAEQ	UK-NEQAS	Total	PNAEQ	UK-NEQAS	PNAEQ e UK-NEQAS	PNAEQ	UK-NEQAS	PNAEQ e UK-NEQAS
2011	-	6	6	-	-11,7	-11,7	-	-1,3	-1,3
2012	1	5	6	1,2	-2,5	-1,8	0,6	-0,6	-0,6
2013	1	5	6	2,2	-0,8	-0,4	-1,1	-1,5	-1,4
2014	1	4	5	-3,0	-4,2	-4,0	-1,7	-2,3	-2,1
<b>Média</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>0,1</b>	<b>-4,8</b>	<b>-4,5</b>	<b>-0,7</b>	<b>-1,4</b>	<b>-1,4</b>

PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade; UK-NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*.

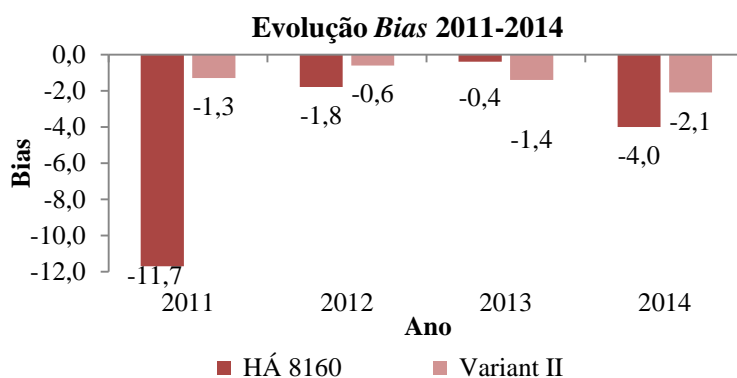


Figura 30: Representação da evolução dos valores de *Bias* obtidos na quantificação da Hb S, por equipamento e entidade responsável por programas de AEQ.

De acordo com a classificação apresentada anteriormente (Tabela 3) e com os resultados apresentados na Tabela 29, a classificação do laboratório foi considerada como questionável no ensaio de 2011 e como satisfatória nos restantes ensaios.

Tabela 29: Valores de ID entre 2011 e 2014 obtidos na quantificação da Hb S no equipamento HA 8160.

Ano	Índice de Desvio HA 8160	
	PNAEQ	UK-NEQAS
2011	-	-2,9
2012	0,3	0,0
2013	-	0,1
2014	-1,0	0,1

ID – índice de desvio; PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade; UK-NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*.

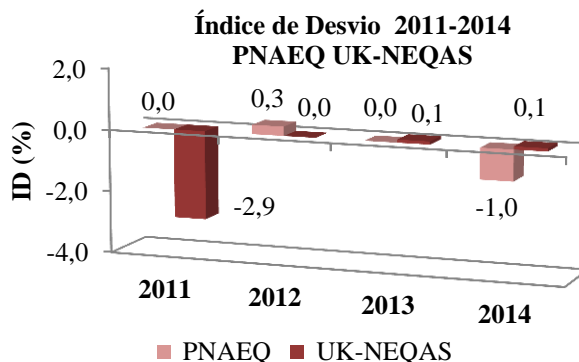


Figura 31: Índice de desvio entre 2011 e 2014, na quantificação da Hb S, no equipamento HA 8160.

### 3.2.6 Erro total da quantificação da Hb S

O ET associado à quantificação de Hb S, em amostras controlo, foi determinado para os dois equipamentos no período em estudo. O valor de ET, correspondente ao equipamento Variant II, variou de 3,1 a 7,2%, enquanto que no equipamento HA 8160 variou de 2,2 a 14,3% (Tabela 30).

Tabela 30: Erro total para a quantificação de amostras de controlo de Hb S, por equipamento, entre 2011 e 2014.

Ano	Equipamento					
	HA 8160			Variant II		
	Bias	CV (%)	ET (%)	Bias	CV (%)	ET (%)
2011	11,7	1,6	14,3	1,3	1,1	3,1
2012	1,8	1,6	4,4	0,6	3,3	6,0
2013	0,4	1,1	2,2	1,4	3,5	7,2
2014	4,0	1,8	7,0	2,1	1,3	4,2

CV – coeficiente de variação; ET – erro total.

A média anual do ET, obtida para o HA 8160, atingiu em 2012 valores superiores a 9,0%. Entre 2012 e 2014 variou de 2,2 a 7,0%. As médias anuais do ET para o Variant II, apresentam um aumento contínuo entre 2011 e 2013 e um decréscimo em 2014.

Como se pode verificar pela Figura 32, apenas o equipamento HA 8160 apresenta uma tendência decrescente do valor de ET, no período em análise (Figura 32).

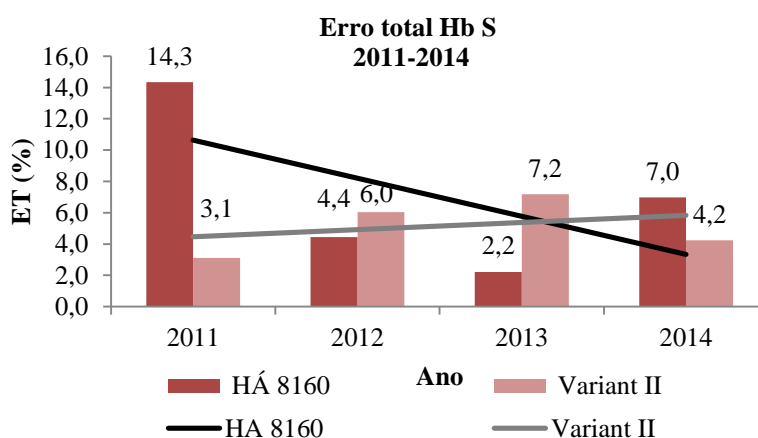


Figura 32: Erro total na determinação de amostras de controlo de Hb S, entre 2011 e 2014.

### 3.3 PNAEQ – Avaliação dos resultados no programa de Avaliação Externa da Qualidade em Hemoglobinopatias 2011 – 2014

#### 3.3.1 Avaliação da participação ativa dos laboratórios e da qualidade das amostras no âmbito do PNAEQ

Entre 2011 e 2014 foram organizados e disponibilizados pelo PNAEQ oito ensaios no âmbito das hemoglobinopatias. O número de laboratórios participantes oscilou entre 21 e 25 laboratórios, com uma participação ativa a variar de 86 a 96% (Tabela 31 e Figura 33).

Tabela 31: Número de laboratórios participantes nos ensaios promovidos pelo PNAEQ no âmbito das hemoglobinopatias, entre 2011 e 2014.

Ano	Ensaio	Nº Laboratórios Participantes	% Participação Ativa
2011	1º	22	91
	2º	22	95
2012	1º	23	91
	2º	23	96
2013	1º	21	86
	2º	23	96
2014	1º	25	96
	2º	25	96

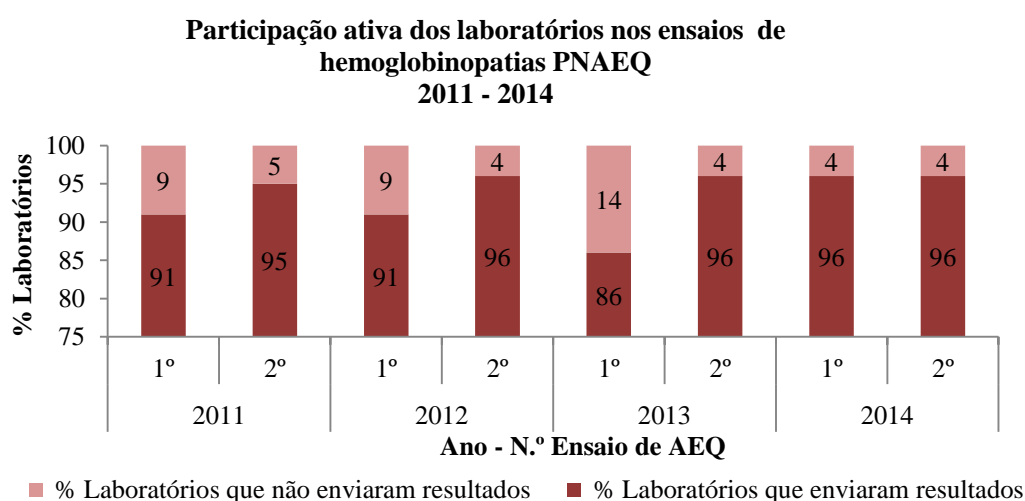


Figura 33: Percentagem de laboratórios que enviaram resultados no programa de hemoglobinopatias, entre 2011 e 2014.

As amostras enviadas nestes ensaios foram amostras liofilizadas (comerciais) ou de sangue total (disponibilizadas pelos laboratórios do grupo de peritos). A qualidade da amostra é um fator muito importante nos ensaios de AEQ que deve ser avaliada. Se a qualidade da amostra for considerada insatisfatória os laboratórios não irão obter resultados exactos. Os critérios aplicados pelos laboratórios participantes na avaliação da qualidade da amostra são, entre outros, a quantidade de amostra disponibilizada, a facilidade na sua reconstituição e a sua estabilidade. A percentagem de laboratórios que considerou a amostra como satisfatória nos diferentes ensaios variou de 72,0% a 85,8% (Figura 34).

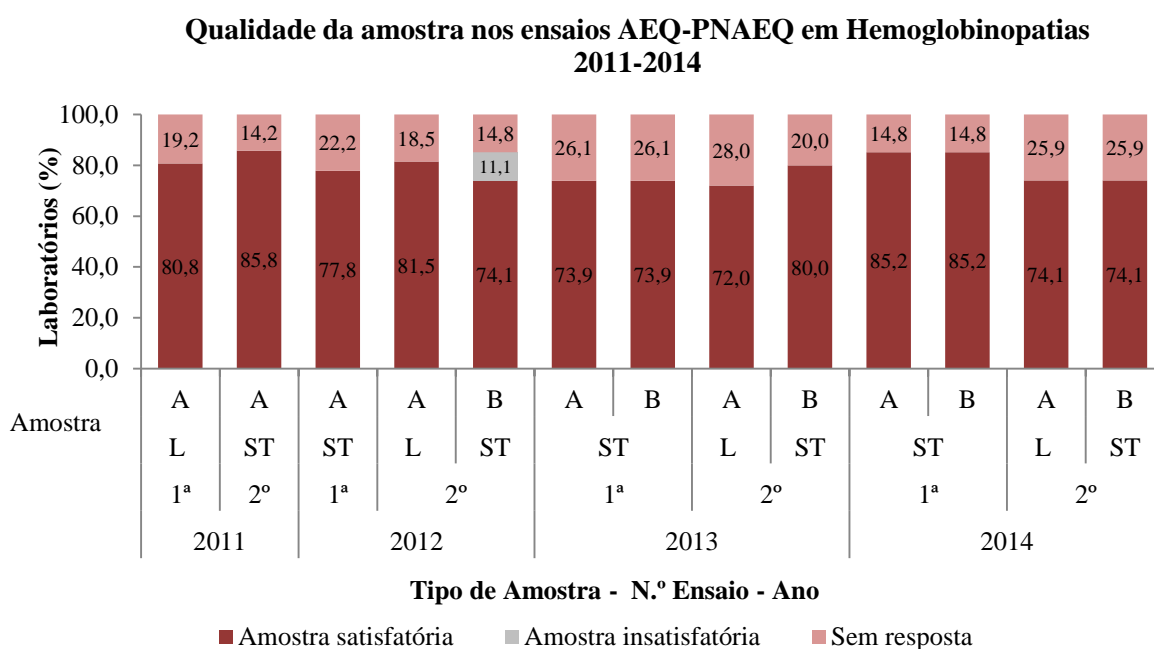


Figura 34: Avaliação das respostas respeitantes à qualidade das amostras enviadas para os laboratórios participantes no programa de hemoglobinopatias (PNAEQ), no período em estudo.  
L – amostra liofilizada; ST – amostra de sangue total

### 3.3.2 Resultados da avaliação do desempenho analítico dos laboratórios participantes no programa de hemoglobinopatias (PNAEQ) 2011- 2014

Após a receção dos resultados dos laboratórios participantes nos ensaios de AEQ, procede-se à introdução dos resultados e aos dados relacionados, nomeadamente métodos, equipamentos, reagentes utilizados. O PNAEQ utiliza um *software* específico, “AEQ genio” que serve para compilação de toda a informação e posterior tratamento estatístico: determinação do número de amostras estudadas, da média, da mediana, do desvio padrão, do coeficiente de variação,

do valor mínimo e do valor máximo segundo a hierarquia: todas as metodologias, metodologia e equipamento. De seguida, serão apresentados os valores da média, do coeficiente de variação, do valor mínimo e do valor máximo para todas as metodologias e por metodologia.

### 3.3.2.1 Avaliação da precisão inter-laboratorial e da inexatidão analítica

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade dos resultados dos laboratórios participantes, foi determinado o valor de CV dos resultados.

#### 3.3.2.1.1 Quantificação da hemoglobina A<sub>2</sub>

Entre 2011 e 2014, foram realizados cinco ensaios para avaliação de amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> dentro do nível normal de concentração e três ensaios para avaliação de amostras de controlo de nível elevado de Hb A<sub>2</sub>. Adotou-se para a Hb A<sub>2</sub> o valor *cutoff* de 3,5% para diferenciar as amostras normais (concentração de Hb A<sub>2</sub> inferior a 3,5%) de amostras de nível elevado (concentração de Hb A<sub>2</sub> superior ou igual a 3,5%).

- Hb A<sub>2</sub> inferior a 3,5% (nível normal)

Na Tabela 32 e na Tabela 33 estão representados, respetivamente, os resultados dos laboratórios peritos (metodologia de HPLC) e dos laboratórios participantes nos ensaios correspondentes à quantificação de amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> de concentração normal.

O valor alvo de Hb A<sub>2</sub> para cada ensaio, corresponde à média da concentração de Hb A<sub>2</sub> determinada pelos laboratórios peritos. Nos ensaios avaliados, o valor alvo variou entre 2,6 e 3,0% e o CV entre 4,6 e 8,5% (Tabela 32).

Entre 2011 e 2014, o valor médio de Hb A<sub>2</sub> variou entre 2,6 e 3,2% e o valor de CV entre 9,6 e 16,1%, em todas as metodologias, e o valor médio de Hb A<sub>2</sub> variou entre 2,6 e 3,2% e o valor de CV entre 6,5 e 14,5%, pela metodologia de HPLC (Tabela 33).

Nos resultados obtidos pelos laboratórios peritos não se verificaram valores superiores a 3,5% (Mín=2,4%; Máx=3,4%). No caso dos participantes, pela metodologia de HPLC, observaram-se valores >3,5% em quatro ensaios (Mín=2,1; Máx=4,5), o que poderia ocasionar a incorreta

identificação da amostra. Conforme esperado, os CV obtidos pelos laboratórios peritos foram, de uma forma geral, inferiores aos CV obtidos pelos laboratórios participantes (Tabela 32 e Tabela 33).

Tabela 32: Estatística dos resultados da quantificação da Hb A<sub>2</sub> obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível normal

Ano	2012	2013	2013	2014	
Nº Ensaio	2º	1º	2º	2º	
Tipo de Amostra	L	ST	L	ST	
HPLC	N	36	20	25	20
	Alvo	3,0	2,6	2,9	3,0
	CV%	8,0	4,6	8,5	8,2
	Mín	2,4	2,4	2,5	2,7
	Máx	3,4	2,8	3,3	3,4

L – Liofilizada, ST – Sangue Total; N: Número de determinações; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação; Alvo – média dos resultados dos laboratórios peritos.

Tabela 33: Tratamento estatístico dos laboratórios participantes para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> (nível normal).

Ano	2011	2012	2013	2014		
Ensaio	1ª	2º	1ª	2º	2º	
Tipo de amostra	L	L	ST	L	ST	
Todos os métodos	N	22	24	21	21	25
	Média	2,7	3,2	2,6	3,1	3,0
	CV%	9,6	14,2	10,5	16,1	10,2
	Mín	1,7	2,5	2,1	2,3	2,5
	Máx	3,2	<b>4,0</b>	<b>4,5</b>	<b>4,0</b>	<b>3,6</b>
HPLC	N	15	16	15	15	19
	Média	2,7	3,2	2,6	3,2	3,1
	CV%	6,5	12,0	11,6	14,5	8,8
	Mín	2,4	2,6	2,1	2,3	2,7
	Máx	2,9	<b>3,9</b>	4,5	<b>3,9</b>	<b>3,6</b>
Eletroforese capilar	N	1	1	2	3	2
	Média	3,1	2,7	2,6	2,6	2,6
	CV%	-	-	-	1,8	-
Cromatografia microcoluna	N	1	1		1	-
	Média	2,3	4,0		2,3	-
Eletroforese densitometria	N	2	3	2	1	3
	Média	2,1	2,8	3,6	2,7	2,3
	CV%	-	12,7	-	-	-

L – liofilizada; ST – sangue total; N – número de laboratórios participantes; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação.

- Hb A<sub>2</sub> superior ou igual a 3,5% (Nível elevado)

Na Tabela 34 e na Tabela 35 estão representados, respetivamente, os resultados dos laboratórios peritos (metodologia de HPLC) e dos laboratórios participantes correspondentes aos ensaios de avaliação de amostras de controlo Hb A<sub>2</sub> de concentração elevada.

O valor alvo de Hb A<sub>2</sub> variou entre 4,8 e 5,2% e o CV entre 7,7 e 11,6% (Tabela 34).

Na avaliação dos resultados dos laboratórios participantes, o valor médio de Hb A<sub>2</sub> variou entre 4,7 e 5,2% e o valor de CV entre 6,3 e 11,4%, em todas as metodologias e o valor médio de Hb A<sub>2</sub> variou entre 4,7 e 5,2% e o valor de CV entre 5,7 e 10,2% por HPLC (Tabela 35).

Tabela 34: Estatística dos resultados da quantificação da Hb A<sub>2</sub> obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC, de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível elevado.

Ano		2013	2014
Ensaio		2°	1°
Tipo de amostra		ST	
HPLC	N	25	20
	Alvo	4,8	5,2
	CV%	11,6	7,7
	Mín	4,1	4,8
	Máx	5,8	5,8

L – Liofilizada, ST – Sangue Total; N: Número de determinações; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação; Alvo – média dos resultados dos laboratórios peritos.

Tabela 35: Tratamento estatístico dos laboratórios participantes para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> (nível elevado).

Ano		2011	2013	2014
Ensaio		1°	2°	1°
Tipo de amostra		L	ST	ST
Todos os métodos	N	23	23	26
	Média	4,7	4,7	5,2
	CV%	6,3	11,4	9,8
	Mín	3,9	3,8	4,2
	Máx	5,2	6,0	6,1
HPLC	N	17	17	21
	Média	4,7	4,8	5,2
	CV%	5,7	10,2	9,1
	Mín	3,9	3,9	4,4
	Máx	5,2	5,7	6,1
Eletroforese capilar	N	-	3	4
	Média	-	4,6	5,5
	CV%	-	3,7	-
Cromatografia microcoluna	N	1	-	-
	Média	4,5	-	-
Eletroforese/densitometria	N	2,0	2,0	2
	Média	4,7	5,3	5,5

L – liofilizada; ST – sangue total; N – número de laboratórios participantes; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação.

Nos resultados obtidos pelos laboratórios peritos não se verificaram valores inferiores a 3,5 % (Mín=4,1%; Máx=5,8%). No caso dos participantes, não se observaram valores inferiores a 3,5 %, mas obtiveram-se valores inferiores a 4,0% em dois ensaios (Mín=3,8; Máx=6,1), o que poderia suscitar algumas dúvidas no diagnóstico nos laboratórios participantes. Os CV obtidos pelos laboratórios peritos foram similares aos CV obtidos pelos laboratórios participantes.



O número de laboratórios que utilizou as técnicas de eletroforese capilar, cromatografia microcoluna ou eletroforese densitometria é bastante inferior comparativamente ao número de laboratórios que recorreu à técnica de HPLC.

Os resultados dos ensaios onde foram analisadas amostras controlo de nível normal de Hb A<sub>2</sub> apresentam, tanto para todas as metodologias, como para a metodologia de HPLC, valores de CV superiores aos obtidos nos ensaios de quantificação de amostras controlo de nível elevado de Hb A<sub>2</sub>. No período em estudo, observou-se uma tendência crescente no valor de CV, embora no ano de 2014 se verifique uma diminuição, com valores de CV a oscilar de 8,8 a 10,2 % (Figura 35).

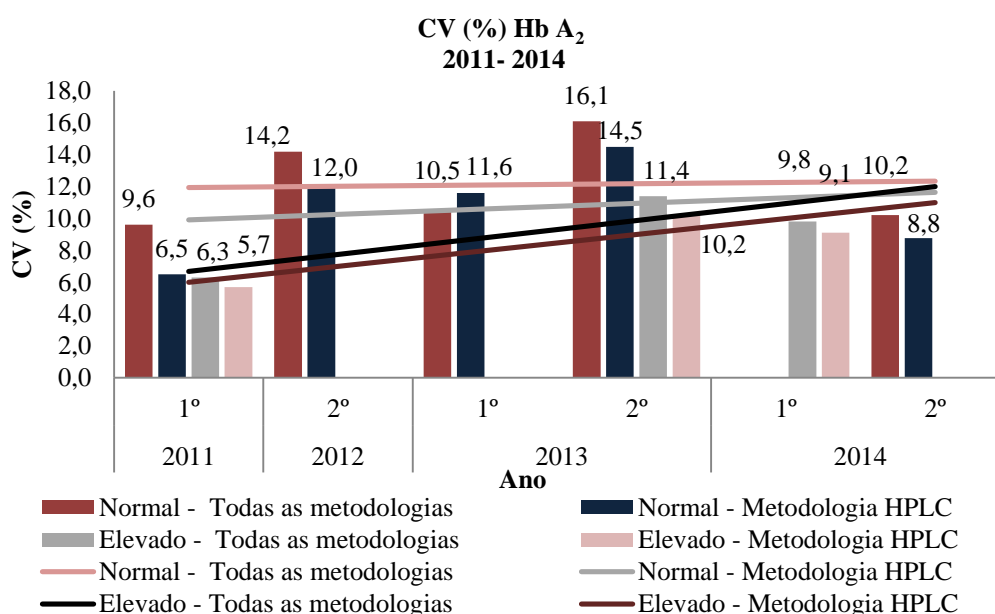


Figura 35: Coeficientes de variação determinados nos ensaios de AEQ para amostras controlo de Hb A<sub>2</sub>.

De acordo com os resultados de um trabalho internacional, que incidiu sobre a determinação da Hb A<sub>2</sub> em diferentes equipamentos de HPLC (do mesmo fabricante), o valor de CV dos laboratórios participantes oscilou entre 6,0 e 8,0 % (Paleari *et al.* 2007). Os valores obtidos no presente estudo foram superiores, logo é necessário aplicar medidas de melhoria contínua de forma a diminuir o grau de imprecisão analítica.

- Avaliação da inexatidão analítica

A inexatidão analítica tem como objetivo avaliar, de forma global, o desempenho do laboratório comparativamente a outros laboratórios.

Uma concentração de Hb A<sub>2</sub> igual a 3,5% foi considerada como valor limite para diferenciar o nível normal do nível elevado. Nos ensaios correspondentes ao nível normal de Hb A<sub>2</sub>, apenas o ensaio realizado em 2011 apresenta resultados satisfatórios, ou seja, o único ensaio cujo valor máximo de Hb A<sub>2</sub> obtido pelos participantes, foi inferior a 3,5%. Nos restantes ensaios, a obtenção de valores superiores a 3,5% poderia ter conduzido a um resultado duvidoso ou a um diagnóstico incorreto de portador de β-talassémia.

Nos ensaios realizados para o doseamento de Hb A<sub>2</sub> em amostras com concentração elevada, não foram obtidos valores inferiores ou iguais ao valor limite (Tabela 36 e Figura 36).

Tabela 36: Análise da inexatidão analítica na quantificação da Hb A<sub>2</sub>.

Nível de Controlo		Normal					Elevado		
Ano		2011	2012	2013	2013	2014	2011	2013	2014
Tipo de Amostra		L	L	ST	L	ST	L	ST	ST
Todos os métodos	N	22	24	21	21	25	23	23	26
	Média	2,7	3,2	2,6	3,1	3,0	4,7	4,7	5,2
	Mín	1,7	2,5	2,1	2,3	2,5	3,9	3,8	4,4
	Máx	3,2	4,0	4,5	4,0	<b>3,6</b>	5,2	6,0	6,1
	Média ±2S	2,2- 3,2	2,3-4,1	2,0- 3,1	2,1- 4,1	2,4- 3,6	4,1- 5,3	3,7- 5,8	3,2 - 6,2
	CV%	9,6	14,2	10,5	16,1	10,2	6,3	11,4	9,8
	R. insat. (%)	0,0	22,7	4,8	28,6	12,0	0,0	0,0	0,0
HPLC	N	15	16	15	15	19	17	17	21
	Média	2,7	3,2	2,6	3,2	3,1	4,7	4,8	5,2
	Mín	2,4	2,6	2,1	2,3	2,7	3,9	3,9	4,4
	Máx	2,9	3,9	4,5	3,9	3,6	5,2	5,7	6,1
	Média ±2S	2,3 - 3,0	2,5-4,0	2,0- 3,2	2,3- 4,1	2,6- 3,6	4,2- 5,2	3,8 5,7	4,2 - 6,2
	CV%	6,5	12,0	11,6	14,5	8,8	5,7	10,2	9,1
	R. insat. (%)	0,0	14,3	6,7	33,3	15,8	0,0	0,0	0,0

L – liofilizada; ST – sangue total; N – número de laboratórios; CV – coeficiente de variação; R. Insat. – Resultados insatisfatórios

Apenas foram obtidos resultados insatisfatórios nos ensaios com amostras de controlo normal. O valor máximo de resultados insatisfatórios (22,7%) está associado ao valor de Hb A<sub>2</sub> (3,2%) mais próximo do valor de *cutoff* (3,5%), bem como ao maior valor de CV (14,2%).

Estes resultados indicam que quanto mais próximo o valor de Hb A<sub>2</sub> estiver do valor de *cutoff* maior é o grau de inexatidão e de resultados insatisfatórios.

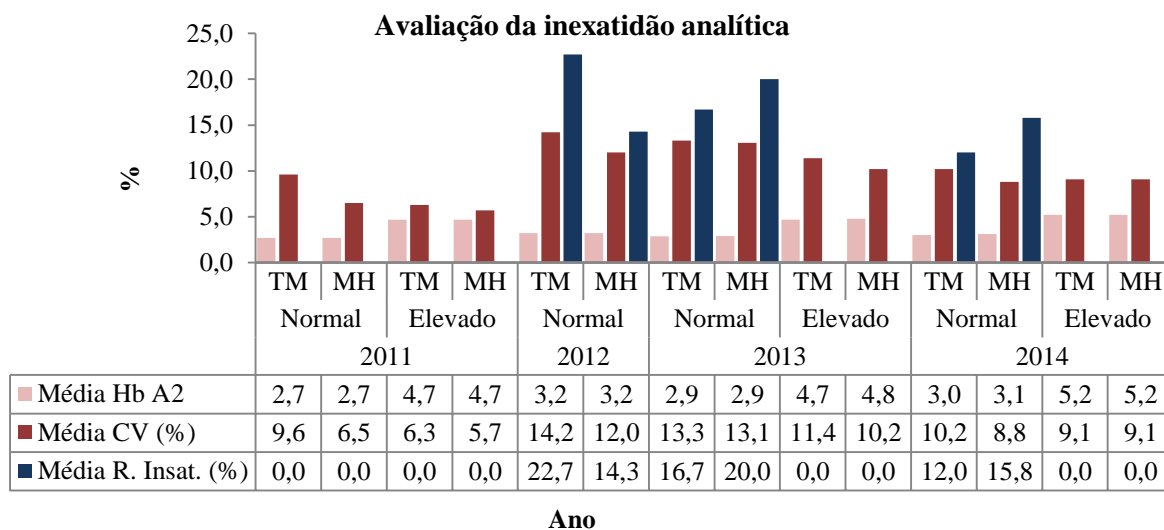


Figura 36: Representação do nível de inexatidão analítica entre 2011 e 2014.  
 TM- Todos os métodos; MH- Método de HPLC; R. Insat. - Resultados insatisfatórios.

### 3.3.2.2 Quantificação da hemoglobina F

Entre 2011 e 2014, foram realizados seis ensaios para avaliação de amostras de controlo de Hb F dentro do nível normal de concentração (Hb F <1,0%) e três ensaios para avaliação de amostras controlo de nível elevado (Hb F ≥1,0%).

- Hb F inferior a 1,0% (Nível normal)

Na Tabela 37 e na Tabela 38 estão representados, respetivamente, os resultados dos laboratórios peritos (metodologia de HPLC) e os resultados dos laboratórios participantes.

Os resultados obtidos pelos laboratórios peritos e pelo grupo de laboratórios participantes, apresentam uma grande variabilidade com valores de CV a variarem, respetivamente, de 0,0 a 118,6% e de 24,0 a 100,0%. Estes valores devem-se, essencialmente, à baixa concentração de Hb F presente nas amostras de controlo.

Tabela 37: Estatística dos resultados da quantificação da Hb F obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível normal.

Ano	2012		2013		2014		
Ensaio	1º	1º	1º	2º	1º	2º	
Tipo de Amostra	ST						
HPLC	N	18	15	10	20	20	20
	Alvo	0,0	0,3	0,1	0,7	0,4	0,2
	CV%	118,6	24,0	0,0	19,3	68,7	24,8
	Mín	0,0	0,2	0,1	0,5	0,0	0,2
	Máx	0,1	0,4	0,1	0,9	0,7	0,4

ST– Sangue Total; N: Número de determinações; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação Alvo- média dos resultados dos laboratórios peritos.

Tabela 38: Tratamento estatístico dos laboratórios participantes para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb F (nível normal).

Ano	2012		2013		2014		
N.º Ensaio	1º	1º	1º	2º	1º	2º	
Tipo de Amostra	ST						
Todos os métodos	N	20,0	18,0	18,0	22,0	21,0	19,0
	Média	0,3	0,4	0,2	0,6	0,4	0,3
	CV%	100,0	42,0	90,0	35,0	58,3	156,2
	Mín	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0
	Máx	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9	2,0
HPLC	N	18,0	17,0	17,0	18,0	19,0	16,0
	Média	0,2	0,4	0,2	0,6	0,4	0,1
	CV%	100,0	37,0	71,0	24,0	55,5	58,1
	Mín	0,0	0,2	0,0	0,4	0,1	0,0
	Máx	0,6	0,8	0,5	0,9	0,8	0,4
Eletroforese capilar	N	-	-	-	3,0	-	-
	Média	-	-	-	0,3	-	-
	CV%	-	-	-	72,0	-	-
Desnaturação alcalina	N	1,0	1,0	1,0	-	-	
	Média	3,7	1,5	1,9	-	-	
Eletroforese densitometria	N	-	-	-	1,0	1,0	2,0
	Média	-	-	-	0,9	0,9	1,1

L – liofilizada; ST – sangue total; N – número de laboratórios participantes; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação.

- Hb F superior a 1% (Nível elevado)

Na Tabela 39 e na Tabela 40 estão representados os resultados dos laboratórios peritos para a metodologia de HPLC e dos laboratórios participantes, respetivamente, correspondentes aos ensaios de avaliação de amostras controlo de Hb F de concentração elevada.

O valor alvo variou entre 1,9 e 5,1% e o CV entre 7,3 e 12,6%. O valor médio dos resultados enviados pelos participantes, para a metodologia de HPLC variou entre 1,1 e 4,9% e o CV entre 7,6 e 10,4% (Tabelas 39 e 40).

Tabela 40: Estatística dos resultados da quantificação da Hb F obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível elevado.

Ano		2012		2013	2014	
Ensaio		2°	2°	2°	1°	2°
Tipo de Amostra		ST				
HPLC	N	24	10	25	20	20
	Alvo	1,9	5,1	2,1	1,2	2,2
	CV%	10,5	7,8	9,5	12,6	7,3
	Mín	1,6	4,7	1,9	1,0	2,0
	Máx	2,1	5,4	2,5	1,4	2,4

ST– Sangue Total; N: Número de determinações; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação Alvo- média dos resultados dos laboratórios peritos.

Tabela 39: Tratamento estatístico dos laboratórios para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb F (nível elevado).

Ano		2011		2012		2013	2014	
Ensaio		1°	2°	2°	2°	2°	1°	2°
Tipo de Amostra		L			ST			
Todos os métodos	N	19	22	21	17	20	24	24
	Média	1,7	4,7	1,8	4,5	1,8	1,1	1,9
	CV%	7,9	8,7	24,5	23,9	24,3	26,7	19,3
	Mín	1,5	3,8	0,7	0,6	0,6	0,3	0,9
	Máx	2,0	5,3	2,5	5,6	2,5	2,1	2,5
HPLC	N	16	18	17	15	16	20	19
	Média	1,8	4,9	2,0	4,8	2,0	1,1	2,1
	CV%	7,6	9,9	10,4	10,2	9,0	9,6	10,1
	Mín	1,5	4,2	1,7	4,1	1,8	0,9	1,8
	Máx	2,0	5,8	2,5	5,6	2,5	1,3	2,5
Eletroforese capilar	N	-	-	1	1	3	2	2
	Média	-	-	1,1	3,9	0,9	1,7	1,3
	CV%	-	-	-	-	26,7	-	-
Desnaturação alcalina	N	1	1	1	1		-	-
	Média	1,6	4,2	0,3	14,2		-	-
Eletroforese densitometria	N	-	2	1	1	1	1	2
	Média		4,4	0,8	0,6	3,3	0,3	1,2

L – liofilizada; ST – sangue total; N – número de laboratórios participantes; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação.

Tal como era esperado, os valores de CV do controlo elevado são, na generalidade, significativamente inferiores aos obtidos para o nível de controlo normal. No nível de controlo normal verifica-se uma tendência decrescente do CV para a metodologia de HPLC. No nível de controlo elevado verifica-se, para todas as metodologias, bem como para a técnica de HPLC, uma tendência decrescente do valor de CV no período em estudo (Figura 37).

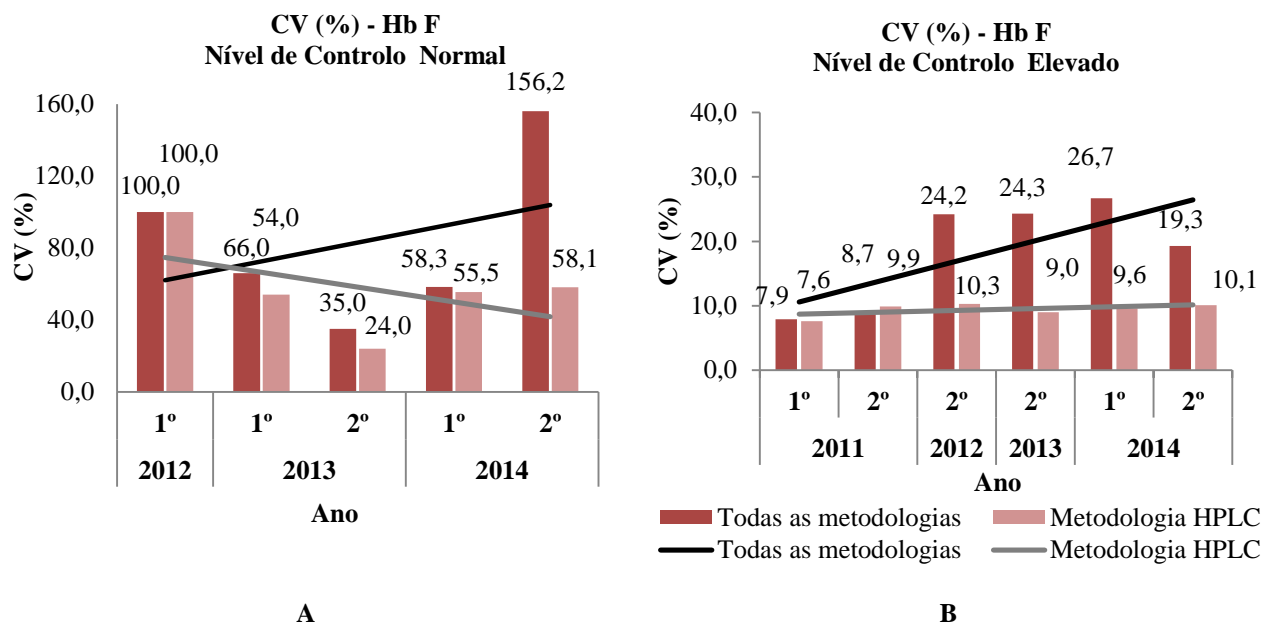


Figura 37: Coeficientes de variação obtidos nos ensaios de AEQ para amostras com concentração de Hb F normal (A) e elevado (B): os valores indicados no 1º ensaio de 2013 (Figura A) e 2º ensaio de 2012 (Figura B) correspondem à média dos resultados obtidos nas diferentes amostras analisadas em cada ensaio.

### 3.3.2.3 Quantificação da hemoglobina S

Nas Tabelas 41 e 42 estão, respetivamente, representados os resultados dos laboratórios peritos para a metodologia de HPLC e dos laboratórios participantes, correspondentes aos ensaios de avaliação de amostras de controlo de Hb S. O valor alvo de Hb S variou de 34,9 a 37,9 e o CV de 1,3 a 4,3%. O valor médio de Hb S, enviado pelos participantes, para todas as metodologias, variou de 34,9 a 37,8% e o valor de CV de 3,0 a 5,5% (Tabelas 41 e 42).

Entre 2011 e 2014, o valor de CV correspondente ao doseamento de Hb S pela metodologia de HPLC, apresenta uma tendência decrescente, logo houve uma melhoria da precisão (Figura 38).

Tabela 42: Estatística dos resultados da quantificação da Hb S obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes.

Ano		2012	2013	2014	
Ensaio		1°	1°	1°	2°
Tipo de amostra		ST			
HLPC	N	27	22	20	20
	Alvo	37,8	37,9	34,9	37,3
	CV%	1,6	1,3	4,3	2,8
	Mín	36,8	36,6	31,9	36
	Máx	38,9	38,4	36,4	38,9

ST – Sangue Total; N: Número de determinações; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação; Alvo - média dos resultados dos laboratórios peritos.

Tabela 41: Tratamento estatístico dos laboratórios para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb S.

Ano		2012	2013	2014	
Ensaio		1°	1°	1°	2°
Tipo de amostra		ST			
Todos os métodos	N	23,0	17,0	23,0	22,0
	Alvo	36,6	37,1	34,9	37,8
	CV%	5,5	4,8	3,3	3,0
	Mín	31,8	32,9	32,7	36,0
	Máx	40,0	40,0	36,4	39,6
HPLC	N	15,0	12,0	16,0	15,0
	Alvo	37,8	36,3	35,0	37,5
	CV%	5,9	5,7	3,4	2,8
	Mín	31,8	32,7	32,7	36,0
	Máx	38,5	39,1	36,4	39,5
Eletroforese capilar	N	2,0	2,0	2,0	2,0
	Alvo	39,6	39,6	36,3	38,3
Eletroforese densitometria	N	2,0	1,0	3,0	4,0
	Alvo	37,1	37,0	34,3	38,2
	CV%	-	-	1,5	3,4

ST – sangue total; N – número de laboratórios participantes; Mín – valor mínimo; Máx – valor máximo; CV – coeficiente de variação

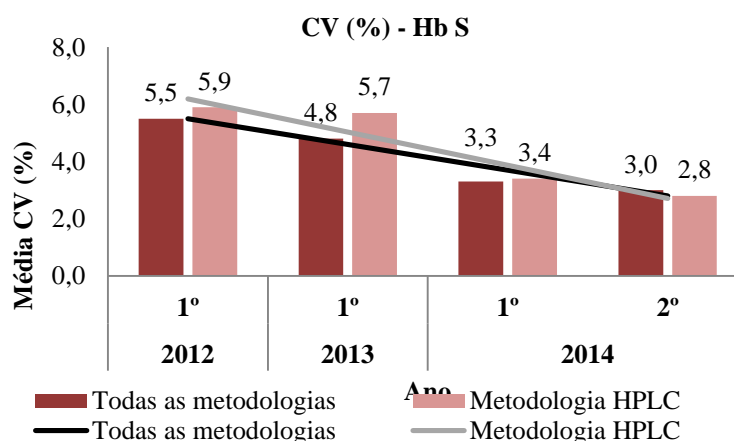


Figura 37: Coeficientes de variação obtidos nos ensaios de AEQ para amostras com concentração de Hb S, usando todas as metodologias e metodologia de HPLC.

## 4 Conclusões

O Controlo de Qualidade Laboratorial através do Controlo de Qualidade Interno (CQI) e da participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), permite avaliar e melhorar, respetivamente, os níveis de precisão e exatidão analítica e, assim, assegurar a fidedignidade dos resultados do laboratório clínico.

O estudo apresentado teve como objetivo analisar os resultados, obtidos entre 2011 e 2014, dos parâmetros hematológicos associados ao diagnóstico de hemoglobinopatias (quantificação das Hb A<sub>2</sub>, Hb F e Hb S), ao nível do controlo interno de qualidade e da participação em ensaios de avaliação externa da qualidade pela Unidade de Referência do Departamento de Promoção para a Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (UDR-DPS) do INSA, bem como ao nível dos programas de avaliação externa organizados pelo Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade.

A avaliação da qualidade do doseamento da Hb A<sub>2</sub>, F e S torna-se difícil uma vez que, atualmente, não existem valores de referência para o grau de imprecisão (coeficiente de variação) e de exatidão (*Bias*) (Mosca et al, 2013).

A avaliação do CQI foi realizada com recurso à análise estatística dos resultados das amostras controlo de Hb A<sub>2</sub>, Hb F e Hb S avaliadas entre 2011 e 2014 na UDR pela metodologia de HPLC (Equipamentos Variant II e HA 8160).

A participação da UDR-DPS em programas de AEQ também foi avaliada através da análise estatística dos resultados do *Bias*, índice de desvio e erro total.

A quantificação da Hb A<sub>2</sub> é fundamental para o diagnóstico de portadores de  $\beta$ -talassémia, que se caracteriza pela presença de diminuição de VGM e HGM e níveis elevados de Hb A<sub>2</sub>. No entanto, a existência de portadores atípicos de  $\beta$ -talassémia com níveis de Hb A<sub>2</sub> próximos do limite considerado normal, dificulta o diagnóstico.

Entre 2011 e 2014, o valor anual de CV variou de 5,9 a 8,5% para níveis de concentração normal de Hb A<sub>2</sub> e de 3,4 a 7,3% para níveis de concentração elevada. Esta diferença de valores de CV entre os dois níveis de concentração deve-se ao facto da concentração de Hb A<sub>2</sub> do nível de controlo normal corresponder aproximadamente a metade da concentração de Hb A<sub>2</sub> do nível de controlo elevado.

Apesar dos valores elevados de CV, verifica-se uma tendência decrescente do valor de CV nas amostras controlo com concentração normal de Hb A<sub>2</sub>. No entanto, para o nível patológico verifica-se a situação inversa. Estes resultados indicam uma melhoria ao



nível da precisão analítica no doseamento de amostras controle de concentração normal. Nas amostras de concentração elevada verifica-se a situação contrária, o que pode condicionar o diagnóstico de  $\beta$ -talassémia.

O *Bias* retrata a proximidade entre o resultado obtido pelo laboratório e o valor alvo, quanto menor for o *Bias*, mais próximo o valor determinado pelo laboratório se encontra do valor alvo. De acordo com os resultados obtidos no período em análise, o equipamento Variant II apresentou um valor médio de *Bias* inferior ao equipamento HA 8160. Assim, para o doseamento da Hb A<sub>2</sub>, o equipamento com maior nível de exatidão foi o Variant II.

Relativamente à análise do índice de desvio, em todos os ensaios de AEQ em que a UDR participou a classificação do laboratório foi sempre considerada como satisfatória. De acordo com a bibliografia consultada, o valor de erro total estabelecido por um grupo de peritos pode atingir valores superiores a 9,0% (Mosca et al, 2013). No ano de 2014 o laboratório da UDR, estabeleceu como objetivo a obtenção de valores de erro total inferiores a 9,0% para ambos os níveis de concentração. Assim no ano de 2014, para ambos os equipamentos, foi atingida a meta instituída. Estes resultados indicam um bom desempenho do laboratório no doseamento da Hb A<sub>2</sub>. No entanto, mantem-se a necessidade de promover uma melhoria contínua no desempenho laboratorial na quantificação da Hb A<sub>2</sub>.

O doseamento da Hb F é importante no diagnóstico de  $\delta\beta$ -talassémia, persistência hereditária da Hb F e no diagnóstico e monitorização de doentes com anemia das células falciformes.

Entre 2011 e 2014, o valor anual de CV variou de 4,6 a 5,9% para níveis de concentração normal de Hb F (< 2,0%) e de 4,8 a 6,6% para níveis de concentração elevada ( $\geq$  2,0%).

Em ambos os níveis de concentração se verifica uma tendência decrescente do valor de CV, ou seja, verifica-se uma diminuição da imprecisão analítica no doseamento da Hb F.

Relativamente à análise do *Bias*, o equipamento Variant II apresentou no período em análise, um valor médio de *Bias* inferior ao equipamento HA 8160. Assim, de acordo com os resultados obtidos, para o doseamento da Hb F, o equipamento com maior nível de exatidão foi o Variant II.

Uma vez que não existem valores de ET estabelecidos para o doseamento da Hb F, nem foi encontrada bibliografia com esta informação, foi considerado como valor limite para

o erro total o mesmo aplicado para a Hb A<sub>2</sub> (9,0%). Assim no ano de 2014, para ambos os equipamentos, foi atingida a meta estabelecida. Estes resultados indicam um bom desempenho do laboratório no doseamento da Hb F.

A quantificação correta da Hb S é muito importante para distinguir os portadores de traço falciforme de outras patologias caracterizadas pela presença de Hb S.

Entre 2011 e 2014, para o doseamento da Hb S o valor anual de CV variou de 1,6 a 2,6%.

Relativamente à análise do *Bias*, o equipamento Variant II apresentou no período em análise, um valor médio de *Bias* inferior ao equipamento HA 8160. Assim de acordo com os resultados obtidos, para o doseamento da Hb S, o equipamento com maior nível de exatidão foi o Variant II.

Relativamente à análise do índice de desvio ao nível do doseamento de Hb S em amostras de controlo, a classificação do laboratório foi considerada como questionável no ensaio de 2011 e como satisfatória nos restantes ensaios.

Uma vez que não existem valores de ET estabelecidos para o doseamento da Hb S, nem foi encontrada bibliografia com esta informação, foi considerado como valor limite para o erro total o mesmo aplicado para a Hb A<sub>2</sub> (9,0%). Apesar da tendência crescente do valor de ET associado ao equipamento Variant II, não se obtiveram valores superiores a 9,0%. No equipamento HA 8160 entre 2012 e 2013 foram obtidos valores de ET inferiores a 9,0%.

Neste estudo foram também analisados os resultados dos programas de AEQ promovidos pelo PNAEQ entre 2011 e 2014 no âmbito das hemoglobinopatias.

No período em estudo foram enviados oito ensaios no âmbito das hemoglobinopatias. O número de laboratórios participantes variou de 21 e 25 laboratórios, com uma participação ativa de 86 a 96%.

Os métodos considerados como satisfatórios para o doseamento da Hb A<sub>2</sub>, com maior precisão (menor valor de CV), foram os métodos automatizados: HPLC e eletroforese capilar, sendo o método de HPLC o mais utilizado pelos laboratórios participantes.

Os resultados dos ensaios onde foram analisadas amostras controlo de Hb A<sub>2</sub> apresentam grande variabilidade entre os diferentes laboratórios, o que aponta para uma maior necessidade de monitorização de desempenho dos laboratórios através da calibração de equipamentos ou de aplicação de medidas de controlo de qualidade interno.

Relativamente à exatidão verificou-se que houve uma percentagem significativa de laboratórios que não efetuou a diferenciação de amostras normais e patológicas, o que alerta para a necessidade da melhoria da qualidade analítica da quantificação da HbA<sub>2</sub>, pela calibração dos equipamentos, utilização de controlo de qualidade interno e participação em ensaios de AEQ. De acordo com os resultados obtidos, quanto mais próximo o valor de Hb A<sub>2</sub> estiver do valor de *cut-off* (3,5%) maior foi a percentagem de resultados insatisfatórios.

Relativamente ao doseamento da Hb F nos ensaios de AEQ, o método mais utilizado pelos laboratórios participantes para o seu doseamento foi a técnica de HPLC.

A variabilidade dos resultados inter-laboratoriais é menor quando se considera apenas a metodologia de HPLC comparativamente com os resultados de todas as metodologias, principalmente na análise de amostras controlo Hb F de nível patológico.

A metodologia mais utilizada pelos laboratórios participantes no doseamento da Hb S foi novamente a técnica de HPLC. Não se verificou diferenças significativas ao nível da variabilidade dos resultados de todos os métodos comparativamente com os resultados da técnica de HPLC.

Ao nível do controlo da qualidade interno, os resultados obtidos neste estudo revelam, que apesar de ter sido atingido as metas definidas, persiste a necessidade de promover uma melhoria contínua no desempenho laboratorial da UDR na quantificação da Hb A<sub>2</sub>, Hb F e Hb S.

Os resultados obtidos nos programas de Avaliação Externa da Qualidade- PNAEQ apontam para a necessidade do envio de amostras controlo, de várias gamas de concentração, incluindo amostras com valores considerados *borderline* e alertam para a necessidade de uma melhoria contínua da qualidade analítica do doseamento da Hb A<sub>2</sub>, Hb F e Hb S através da calibração dos equipamentos bem como através da avaliação do controlo da qualidade interno e participação em ensaios de Avaliação Externa da Qualidade. A monitorização do desempenho permitiu o conhecimento do estado da arte atual e posterior comparação com os pares internacionais.

## 5 Bibliografia

- Bain, B. J. (2006) *Haemoglobinopathy Diagnosis*, Second Edition, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Brants, A. (2011) Hemoglobinopathy and thalassemia detection Traditional methods and a novel method — capillary electrophoresis technology. *Medical Laboratory Observer*.
- Ceriotti, F. (2014) The role of External Quality Assessment Schemes in Monitoring and Improving the Standardization Process. *Clinica Chimica Acta*, 432, 77–81
- Chaves, C. D. (2013) Controlo de qualidade no laboratório de análises clínicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 46.
- Clarke, G. M. et Higgins, T. N. (2000). Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. *Clinical Chemistry*. 46:8, 1284–1290.
- Decreto-Lei n.º 27/2012 de 8 de Fevereiro de 2012, *Diário da República n.º28/12- I Série*. Ministério da Saúde. Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 217/99 de 15 de Junho de 1999, *Diário da República n.º 137/99 - I Série A*. Ministério da Saúde. Lisboa.
- Fuentes-Arderiu, X., Batista-Castellví, J., Canalias, F., Dot-Bach, D., Martínez-Casademont, M., & Miró-Balagué, J. (2007). Internal quality control and ISO 15189. *Accreditation and Quality Assurance*, 12(7), 369-375.
- Galanello, R. e Cao, A. (2011) Alpha-thalassemia. *Genetics IN Medicine*. 13(2):83–88. doi: 0.1097/GIM.0b013e3181fcb468.
- Giordano, P. C., Hartevelde, C. L. e Bakker, E.(2014) Genetic Epidemiology and Preventive Healthcare in Multiethnic Societies: The Hemoglobinopathies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11 (6136-6146). doi:10.3390/ijerph110606136.
- Hartevelde, C. L. e Higgs, D. R. (2010)  $\alpha$ -thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 5:13. doi: 10.1186/1750-1172-5-13.
- Hartevelde, C. L. (2014) State of the art and new developments in molecular diagnostics for hemoglobinopathies in multiethnic societies. *International Journal of Laboratory Hematology*. 36, 1–12. doi:10.1111/ijlh.12108
- Hawkins, R. (2012) Managing the Pre- and Post-analytical Phases of the Total Testing Process. *Annals of Laboratory Medicine*, 32, 5-16, doi: 10.3343/alm.2012.32.1.5
- <http://www.westgard.com/westgard-rules-and-multirules.htm> acedido a 5 de outubro de 2014
- Inez, F. Sequeira, M., Santos, P., Santos, R. Nunes, E., Cavaco, A., ...Martins, M. (1993) Contribuição do rastreio de portadores para a prevenção da  $\beta$ -talassémia e da drepanocitose na população portuguesa: um estudo multicêntrico. *Arquivos do Instituto Nacional de Saúde*, 19.
- ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.(2005)International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO/TS 22367:2008. Medical laboratories — Reduction of error through risk management and continual improvement.(2008) International Organization for Standardization / Technical Specification, Genève, Switzerland.
- ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment — General requirements for proficiency testing. (2010) International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission, Genève, Switzerland.

- ISO 15189:2012 Medical laboratories -- Requirements for quality and competence. (2012). International Organization of Standardization, Genève, Switzerland.
- Kanter, J. e Kruse-Jarres, R. (2013) Management of sickle cell disease from childhood through adulthood. *Blood Reviews*, 27, 279–287.
- Kohne, E. (2011) Hemoglobinopathies Clínicas Manifestations, Diagnosis, and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*. 108(31–32): 532–40. doi: 10.3238/arztebl.2011.0532
- Lervolino, L. G., Baldin, P. E. A., Picado, S. M., Calil, K. B., Viel, A. A., Campos, L. A. F. (2010) Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 33 (1), 49-54. DOI: 10.5581/1516-8484.20110015
- Libeer, J-C (2001) Role of external quality assurance schemes in assessing and improving quality in medical laboratories. *Clínica Chimica Acta*, 309, 173–177,
- Manwani, D. e Frenette, P. S. (2013) Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *American Society of Hematology*.
- Martins, M. C., Olim, G., Melo, J., Magalhaes, H. A., Rodrigues, M. (1993) Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *Journal of Medical Genetics*. 30: 235-239.
- Ministério da Saúde: Gabinete da Ministra. Despacho nº 8835/2001. Diário da República, 27 de Abril 2001; 2ª série (nº 98): 7383-7396.
- Miranda, A., Costa, S., Seuanes, F., Gaspar, G., Seixas, T. (2013) *Estudo bioquímico de portadores de hemoglobinopatias*. Observações\_Boletim Epidemiológico INSA
- Mosca, A., Paleair, R. e Wild, B. (2013) *Analytical goals for the determination of Hb A<sub>2</sub>*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(5): 937–941, DOI 10.1515/cclm-2012-0575
- Oliveira, C. A. e Mendes, M. E. (2010) Gestão da Fase Analítica do Laboratório como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: *ControlLab Controle de Qualidade para Laboratórios LTDA*.
- Paleari, R., Giambona, A., Cannata, M., Leto, F., Maggio e A., Mosca, A. (2007) External quality assessment of Hb A<sub>2</sub> measurement: data from an Italian pilot study with fresh whole blood samples and commercial HPLC systems. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45:88–92
- Pang, R. (2009) A Practical Guide to Internal Quality Control (IQC) for Quantitative Tests in Medical Laboratories (Proposed Guidelines). *Hong Kong Association of Medical Laboratories Ltd*.
- Petersen, PH, Ricós, C, Stöckl, D, Libeer, JC, Baadenhuijsen, H, Fraser, C,..., Thienpont L. (1996) Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, 34 (12):983-99.
- Plebani, M., (2002) Charting the course of medical laboratories in a changing environment. *Clínica Chimica Acta*, 319, 87–100.
- Plebani, M. (2005) External Quality Assessment Programs; Past, Present and Future. *Jugoslov Med Biochem*, 24, 201– 206.
- Plebani, M., (2006) Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 44 (6), 750–759, doi: 10.1515/CCLM.2006.123.
- Plebani, M., Sciacovelli, L., Aita, A., Chiozza, M. L. (2014) Harmonization of pre-analytical quality indicators. *Biochemia Medica*, 24 (1), 105–13. doi: 10.11613/BM.2014.012.

- Prevenção das formas graves de hemoglobinopatia, Circular Normativa nº 5/DSMI, Direção Geral da Saúde, de 18 de Dezembro (1996)
- Prevenção das formas graves de hemoglobinopatia. Circular Normativa nº18/DSMIA. Direção Geral da Saúde de 7 de Setembro (2004).
- Rappaport, Valerie J., Velazquez, Maria, Williams, Kayon, (2004). Hemoglobinopathies in pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 31, 287 – 317. doi:10.1016/j.ogc.2004.03.006
- Ribeiro, M. L., (2011) Talassémias. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 42 (5)
- Rin, G. (2009) Pre-analytical workstations: A tool for reducing laboratory errors. *Clínica Chimica Acta*, 404, 68–74, doi:10.1016/j.cca.2009.03.024.
- Ryan, K., Bain, B. J., Worthington, D., James, J., Plews, D., Mason, A. ... Streetly, A. (2010) Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *British Journal of Haematology*, 149 (1), 35-49, doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08054.x.
- Sarnaik, S. A. (2005) *Thalassemia and Related Hemoglobinopathies*. *Indian Journal of Pediatrics*. 72 (4), 319-324.
- Sciacovelli, L., Secchiero, S., Zardo, L., Zaninotto, M e Plebani, M. (2006) External Quality Assessment: an effective tool for Clinical Governance in Laboratory Medicine. *Clínical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(6), 740–749, doi: 10.1515/CCLM.2006.133.
- Sciacovelli, L., Zardo, L., Secchiero, S., Plebani, M. (2004) Quality specifications in EQA schemes: from theory to practice. *Clínica Chimica Acta*, 346, 87–97.
- Sonati, M. F. e Costa, F. F. (2008) The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *Jornal de Pediatria*. 84(41):S40-51. doi:10.2223/JPED.1802.
- Steinberg, M. H. (2008) Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *The Scientific World Journal*, 8 (1295–1324). doi: 10.1100/tsw.2008.157
- Steinberg, MH e Adams, JG (1991) Hemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath. *Blood Journal*. 78, 2165-2177.
- Vieira, K. F., Shitara. E. S., Mendes, M. E., Sumita N. M. (2011) Usefulness of quality indicators in the management of clinical laboratories. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 47 (3), 201-210.
- VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia) 3ª Edição (2008). Instituto Português da Qualidade
- Weatherall, D.J. e Clegg, J.B. (2001) Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*. 79 (8), 704-12.
- Westgard, J. O. (2013) Perspectives on Quality Control, Risk Management, and Analytical Quality Management. *Clinics in Laboratory Medicine*, 33, 1–14, doi: 10.1016/j.cll.2012.10.003
- Westgard, J., Barry, P. L. e Hunt, M. R. (1981) A Multi-Rule Shewhart Chart for Quality Control in Clinical Chemistry. *Clinical Chemistry*. 27/3, 493-501.
- Williams, T. N. e Weatherall, D. J. (2012) World Distribution, Population Genetics, and Health Burden of the Hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2. doi: 10.1101/cshperspect.a011692.

# 6 Anexos

## Anexo I: Poster exposto no 42º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas intitulado de “CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO E AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE PARA A QUANTIFICAÇÃO DA Hb A<sub>2</sub>”

### CONTROLO DA QUALIDADE INTERNO E AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE PARA A QUANTIFICAÇÃO DA HbA<sub>2</sub>

Filipa Vilhena<sup>1</sup>, Filomena Seunares<sup>2</sup>, Sandra Copeto<sup>2</sup>, Sandra Costa<sup>2</sup>, Helena Correia<sup>2</sup>, Ana Cardoso<sup>2</sup>, Armandina Miranda<sup>2</sup>, Ana Paula Faria<sup>2</sup>  
 Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz<sup>1</sup>, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge Lisboa<sup>2</sup>

#### INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias são doenças monogénicas de transmissão autossómica recessiva, causadas por mutações nos genes que codificam para as cadeias globínicas, ou nas suas regiões regulatórias. Podem conduzir à síntese reduzida da hemoglobina (Hb) (talassemias) ou à formação de hemoglobinas estruturalmente anómalas (variantes). Em Portugal, a percentagem de portadores de hemoglobinopatias na população em geral varia entre 0,5 e 2,0%<sup>1</sup>.

A quantificação da Hb A<sub>2</sub> é essencial na deteção de portadores de β-talassemia, sendo muito importante na prevenção do aparecimento de formas graves de hemoglobinopatias. A deteção de portadores de β-talassemia é facilmente realizada nos fenótipos clássicos caracterizados por aumento da Hb A<sub>2</sub> (4-6%) e diminuição dos índices eritrocitários (VGM e HGM). No entanto, devido à proximidade entre os valores de Hb A<sub>2</sub> normais e patológicos, e aos fenótipos atípicos, com índices eritrocitários próximos do normal e valores de Hb A<sub>2</sub> *borderline* (3,3-3,8%), é muito importante determinações com alto grau de reprodutibilidade e exatidão<sup>2,3</sup>.

O Controlo da Qualidade Laboratorial através do Controlo da Qualidade Interno (CQI) e da participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), permite avaliar e melhorar os níveis de precisão e exatidão analítica, possibilitando a longo termo, uma avaliação retrospectiva do desempenho do laboratório, demonstrando a sua competência relativamente aos seus pares.

**Objetivo:** Análise dos resultados do CQI e da AEQ (PNAEQ-Portugal e NEQAS-Reino Unido), da quantificação da Hb A<sub>2</sub> pela metodologia de HPLC, do laboratório de hemoglobinopatias do INSA, no período de 2011 a 2014.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se amostras de controlo da qualidade com concentrações normais e elevadas de Hb A<sub>2</sub>. Na AEQ analisaram-se as amostras distribuídas pelos organizadores dos programas de AEQ, PNAEQ-Portugal e NEQAS-Reino Unido. A metodologia utilizada foi a cromatografia por HPLC e os equipamentos avaliados neste estudo foram o Arkray HA-8160 (Menarini) e o Variant II- *Beta-thal short program* (BioRad).

Ao nível do CQI foi realizada uma análise estatística dos resultados através da determinação do valor médio, do desvio padrão (s) e do coeficiente de variação (CV). A análise dos resultados dos programas de AEQ envolveu a determinação do erro sistemático (*Bias*) e do índice de desvio (ID). Foi também calculado o Erro Total (ET). O *Bias* foi calculado pela diferença entre o valor obtido pelo laboratório e o valor alvo (média de consenso obtida para o método/equipamento) a dividir pelo valor alvo e expresso em percentagem:

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

O ID, é utilizado como indicador de desempenho do laboratório participante comparativamente aos dos outros laboratórios, e é fornecido pelo organizador do programa e calculado pela fórmula:

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

O ET corresponde à associação entre o erro aleatório e o erro sistemático, ou seja entre o CQI e a AEQ, e foi calculado pela fórmula:  $ET = |Bias| + Z \times CV$   
Z=1,65

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### Controlo de Qualidade Interno

O CQI teve como objetivo a avaliação da reprodutibilidade dos resultados, pelo cálculo do CV%.

Os CV % anuais, obtidos para a quantificação da Hb A<sub>2</sub> por HPLC (HA-8160 e Variant II) e nível de concentração de Hb A<sub>2</sub>, entre 2011 e 2014, oscilaram de 1,9% a 4,9%. No período em estudo, a média de CV para o HA-8160 foi de 2,6% e para o Variant II foi de 3,4% (Tabela 1).

Ano	Hb A <sub>2</sub> < 3,8%				Hb A <sub>2</sub> ≥ 3,8%				Média CV
	Variant II	HA-8160	Variant II	HA-8160	Variant II	HA-8160	Variant II	HA-8160	
	N	Media (%)	CV (%)	N	Media (%)	CV (%)	N	Media (%)	CV (%)
2011	56	2,4	3,6	117	2,9	1,8	43	6,4	4,0
2012	74	2,8	4,9	83	3,3	3,6	77	5,8	3,3
2013	104	2,8	2,8	119	3,1	2,4	98	5,7	2,3
2014	97	2,8	3,5	68	3,2	2,9	72	5,8	2,4
Média	79		3,7	97		3,1	77		3,1

Tabela 1: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> nos equipamentos HA-8160 e Variant II - 2011-2014.

O equipamento HA-8160 apresenta uma média dos CV mais baixa que o Variant II (2,6% e 3,4%, respetivamente), durante o período em estudo, no entanto verificou-se uma tendência de melhoria na reprodutibilidade do Variant II, obtendo-se em 2014, um CV de 3,0% (Figura 1).

##### Avaliação Externa da Qualidade

Os resultados da AEQ foram avaliados pelo ID, pelo cálculo do *Bias* e pelo cálculo do Erro Total.

	Hb A <sub>2</sub> < 3,5%				Hb A <sub>2</sub> ≥ 3,5%				Média									
	Variant II	HA-8160	Variant II	HA-8160	Variant II	HA-8160	Variant II	HA-8160	Bias	CV	ET	Bias	CV	ET				
2011	1,3	3,6	7,2	3,3	1,9	6,4	0,3	4,0	6,9	4,8	2,3	8,4	-1,0	3,8	7,3	1,8	2,1	6,3
2012	2,8	4,9	10,9	6,6	3,6	11,4	0,0	3,3	6,4	2,4	3,3	7,8	2,6	4,1	9,4	4,8	3,5	10,6
2013	3,1	2,8	7,7	2,1	2,4	6,1	2,7	2,3	6,5	8,2	2,3	12,0	1,8	2,6	6,0	2,5	2,4	6,4
2014	0,2	3,5	6,0	5,1	2,9	9,8	2,4	2,4	6,4	1,2	2,3	6,0	-0,3	3,0	5,2	4,3	2,6	8,6

Tabela 2: Análise estatística dos resultados da AEQ, da quantificação da Hb A<sub>2</sub>, relativos ao desempenho na participação nos programas PNAEQ e NEQAS, 2011-2014.

O valor do *Bias*, entre 2011 e 2014, oscilou para os dois equipamentos em estudo entre -8,2 e 5,5%. A média dos *Bias* oscila abaixo e acima da linha do zero no caso do Variant II e mantém-se sistematicamente positivo no HA 8160, indicando um erro sistemático para valores acima do alvo (Figura 2).

A média anual do ID, obtida para os programas de AEQ, variou entre -0,9 e +0,7, oscilando entre valores positivos e negativos como é desejável. No caso da média dos ID obtidos no PNAEQ verifica-se que são sempre negativos, o que requer monitorização (Figura 3).

##### CONCLUSÃO

Considera-se que as metas analíticas definidas para a Hb A<sub>2</sub>, ET < 9%, para 2014 foram atingidas. No entanto de acordo com os objetivos definidos internacionalmente (Andrea Mosca *et al.* Analytical goals for the determination of Hb A<sub>2</sub>), mantem-se a necessidade de promover uma melhoria contínua no desempenho laboratorial da quantificação da Hb A<sub>2</sub>.

**Bibliografia:**  
 1. Martin M, C, *et al.* Hereditary anemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet* 1993; 30:236-39.  
 2. Thomas Patena *et al.* Journal of Medical Genetics. External quality assessment of HbA<sub>2</sub> measurement: data from an inter-laboratory study with fresh whole blood samples and commercial HPLC. 2017; 54(1):188-90.  
 3. Andrea Mosca *et al.* Analytical goals for the determination of HbA<sub>2</sub>. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 88-92. Mosca A, Patena R *et al.* Analytical goals for the determination of HbA<sub>2</sub>. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(9): 937-41.

42º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas | 21-24 Junho 2015 - Rio de Janeiro



# Anexo II: Poster exposto no 42º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas intitulado de “AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DO PROGRAMA NACIONAL DE AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE-PNAEQ NA QUANTIFICAÇÃO DA Hb A<sub>2</sub>”

## AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DO PROGRAMA NACIONAL DE AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE-PNAEQ NA QUANTIFICAÇÃO DA Hb A<sub>2</sub>

Filipa Vilhena<sup>1</sup>, Helena Correia<sup>2</sup>, Ana Cardoso<sup>2</sup>, Filomena Seuanez<sup>2</sup>, Sandra Copeto<sup>2</sup>, Sandra Costa<sup>2</sup>, Armandina Miranda<sup>2</sup>, Ana Faria<sup>2</sup>  
 Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz<sup>1</sup>, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge Lisboa<sup>2</sup>

### INTRODUÇÃO

A melhoria contínua constitui um dos objetivos principais do laboratório clínico. Devem ser utilizadas metodologias de controlo de qualidade interno e participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade, que permitam identificar, prevenir e corrigir possíveis erros. A Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) tem como objetivo avaliar o desempenho do laboratório clínico comparativamente a outros laboratórios contribuindo para a harmonização dos resultados.

Nos portadores de β-Talassemia, caracterizados pela diminuição da síntese de cadeias do tipo β da hemoglobina A, a correta quantificação da Hb A<sub>2</sub> é essencial no seu diagnóstico laboratorial.

### MATERIAL E MÉTODOS

Análise estatística dos resultados da quantificação da Hb A<sub>2</sub> dos laboratórios participantes nos ensaios de AEQ realizados no âmbito das hemoglobinas, no período de 2011 a 2014. Foram analisados os resultados de cinco ensaios para avaliação de amostras de nível normal (HbA<sub>2</sub> <3,5%) e três ensaios de nível elevado (HbA<sub>2</sub> ≥3,5%), pela determinação do valor mínimo e máximo, média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV). O valor alvo foi obtido pelo cálculo da média de resultados obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Hb A<sub>2</sub> < 3,5%**

No período em estudo, nas amostras normais (HbA<sub>2</sub> < 3,5%), o valor alvo oscilou entre 2,6% e 3,0% e o CV correspondente entre 4,6 e 8,5% (Tabela 1).

Ano	2012		2013		2014	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Nº Ensaio	L	ST	L	ST	L	ST
Tipo de Amostra	N	36	20	25	20	25
	Min	2,4	2,4	2,5	2,7	2,7
	Máx	3,4	2,8	3,3	3,4	3,4
HPLC	Alvo	3,0	2,6	2,9	3,0	3,0
	CV%	8,0	4,6	6,5	8,2	8,2

Tabela 1: Estatística dos resultados de quantificação da HbA<sub>2</sub> obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível normal. L – Liofilizada, ST – Sangue Total, N – Número de determinações, Min – valor mínimo, Máx – valor máximo, CV – coeficiente de variação. Alvo – média dos resultados dos laboratórios peritos.

**Hb A<sub>2</sub> ≥ 3,5%**

No período em estudo, nas amostras patológicas (HbA<sub>2</sub> ≥ 3,5%), o valor alvo oscilou entre 4,8% e 5,2% e o CV correspondente entre 7,7 e 11,6% (Tabela 2).

Ano	2013		2014	
	1º	2º	1º	2º
Nº Ensaio	L	ST	L	ST
Tipo de amostra	N	25	20	20
	Min	4,1	4,8	4,8
	Máx	5,8	5,8	5,8
HPLC	Alvo	4,8	5,2	5,2
	CV%	11,6	7,7	7,7

Tabela 2: Estatística dos resultados de quantificação da Hb A<sub>2</sub> obtidos pelos laboratórios peritos em equipamentos de HPLC de diferentes modelos e fabricantes, em amostras de nível elevado. L – Liofilizada, ST – Sangue Total, N – Número de determinações, Min – valor mínimo, Máx – valor máximo, CV – coeficiente de variação. Alvo – média dos resultados dos laboratórios peritos.

O valor médio de Hb A<sub>2</sub> determinado pelos laboratórios participantes, pela metodologia de HPLC, no mesmo período de tempo oscilou entre 2,6 e 3,2% e o valor de CV entre 6,5 e 14,5% (Tabela 3).

Ano	2011		2012		2013		2014	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Ensaio	L	L	L	L	L	L	L	L
	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Tipo de amostra	N	22	24	21	21	25	25	25
	Média	2,7	3,2	2,6	3,1	3,0	3,0	3,0
	CV%	9,6	14,2	10,5	16,1	10,2	10,2	10,2
Todos os métodos	Min	1,7	2,5	2,1	2,3	2,5	2,5	2,5
	Máx	3,2	4,0	4,5	4,0	3,6	3,6	3,6
	N	15	16	15	15	19	19	19
Equipamentos HPLC	Média	2,7	3,2	2,6	3,2	3,1	3,1	3,1
	CV%	6,5	12,0	11,6	14,5	8,8	8,8	8,8
	Min	2,4	2,6	2,1	2,3	2,7	2,7	2,7
Equipamentos HPLC	Máx	2,9	3,9	4,5	3,9	3,6	3,6	3,6
	N	1	1	2	3	2	2	2
	Média	3,1	2,7	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Eletrforese capilar	CV%	-	-	-	1,8	-	-	-
	N	1	1	1	1	-	-	-
Cromatografia microcoluna	Média	2,3	4,0	-	2,3	-	-	-
	N	2	3	2	1	3	3	3
Eletrforese/densitometria	Média	2,1	2,8	3,6	2,7	2,3	2,3	2,3
	CV%	-	-	12,7	-	-	-	-

Tabela 3: Tratamento estatístico dos resultados dos laboratórios participantes para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> (nível normal). L – liofilizada, ST – sangue total, N – número de laboratórios participantes, Min – valor mínimo, Máx – valor máximo, CV – coeficiente de variação.

O valor médio de Hb A<sub>2</sub> determinado pelos laboratórios participantes, pela metodologia de HPLC, no mesmo período de tempo, variou entre 4,7 e 5,2% e o valor de CV entre 5,7 e 10,2% (Tabela 4).

Ano	2011		2013		2014	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Ensaio	L	L	L	L	L	L
	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Tipo de amostra	N	23	23	26	26	26
	Média	4,7	4,7	5,2	5,2	5,2
	CV%	6,3	11,4	9,9	9,9	9,9
Todos os métodos	Min	3,9	3,8	4,2	4,2	4,2
	Máx	5,2	6,0	6,1	6,1	6,1
	N	17	17	21	21	21
Equipamentos HPLC	Média	4,7	4,8	5,2	5,2	5,2
	CV%	5,7	10,2	9,1	9,1	9,1
	Min	3,9	3,9	4,4	4,4	4,4
Equipamentos HPLC	Máx	5,2	5,7	6,1	6,1	6,1
	N	-	3	4	4	4
	Média	-	4,6	5,0	5,0	5,0
Eletrforese capilar	CV%	-	3,7	3,7	3,7	3,7
	N	1	-	-	-	-
Cromatografia microcoluna	Média	4,5	-	-	-	-
	N	2	2	3	3	3
Eletrforese/densitometria	Média	4,7	5,3	5,4	5,4	5,4
	N	2	2	3	3	3

Tabela 4: Tratamento estatístico dos resultados dos laboratórios participantes para as diferentes metodologias utilizadas na avaliação de amostras de controlo de Hb A<sub>2</sub> (nível elevado). L – liofilizada, ST – sangue total, N – número de laboratórios participantes, Min – valor mínimo, Máx – valor máximo, CV – coeficiente de variação.

Os CV obtidos pelos laboratórios peritos (2,6 a 8,5%) foram inferiores aos CV obtidos pelos laboratórios participantes (6,5 a 14,5%).

Os valores médios de Hb A<sub>2</sub> obtidos pelos laboratórios peritos e pelos participantes, foram inferiores a 3,5%, valor considerado como *cut off*, para diferenciar amostras normais de amostras potencialmente patológicas. Nos resultados obtidos pelos laboratórios peritos não se verificaram valores superiores a 3,5% (Min=2,4%; Máx=3,4%). No caso dos participantes, observaram-se valores >3,5% em quatro ensaios (Min=2,1; Máx=4,5) (Tabela 1 e Tabela 2), o que poderia ocasionar a incorreta identificação da amostra.

Os CV obtidos pelos laboratórios peritos foram similares aos CV obtidos pelos laboratórios participantes (Tabela 3 e Tabela 4).

Os valores médios de Hb A<sub>2</sub> obtidos pelos laboratórios peritos e pelos participantes, foram superiores a 3,5%, valor considerado como *cut off*, para diferenciar amostras normais de amostras potencialmente patológicas.

Nos resultados obtidos pelos laboratórios peritos não se verificaram valores inferiores a 4,0% (Min=4,1%; Máx=5,8%). No caso dos participantes, observaram-se valores inferiores a 4,0% em dois ensaios (Min=3,8; Máx=6,1) (Tabela 1 e Tabela 2), o que poderia ocasionar algumas dúvidas no diagnóstico.

Figura 1: Coeficientes de variação dos resultados dos laboratórios participantes do PNAEQ, no período de 2011-2014, de amostras normais e patológicas, para os ensaios de quantificação da Hb A<sub>2</sub>.

No período em estudo, observou-se uma tendência crescente nos CVs embora no ano de 2014 se verifique já uma inversão dessa situação, com valores de CV a oscilar de 8,8 a 10,2% (Figura 1). Como esperado, os CVs obtidos por HPLC, de um modo geral, são inferiores aos obtidos pela análise de todas as metodologias, oscilando entre 5,7 a 14,5%. Em comparação com resultados obtidos num estudo de avaliação da reprodutibilidade da determinação da Hb A<sub>2</sub>, em diferentes equipamentos de HPLC (do mesmo fabricante), em que o CV oscilou entre 6,0 e 8,0%<sup>1</sup>, consideramos importante o acompanhamento dos resultados com vista à melhoria contínua.

### CONCLUSÃO

Os resultados apontam para uma variação inter-laboratorial não negligenciável com CV para o grupo dos HPLC de 5,7 a 14,5%. Relativamente à exatidão verificou-se que houve uma percentagem significativa de laboratórios que não efetuou a diferenciação de amostras normais e patológicas, o que alerta para a necessidade da melhoria da qualidade analítica da quantificação da HbA<sub>2</sub>, pela calibração dos equipamentos, utilização de controlo de qualidade interno e participação em ensaios de AEQ. Por outro lado os resultados apontam para a necessidade do envio de amostras controle, por parte dos organizadores dos programas de AEQ, de várias gamas de concentração, incluindo amostras com valores considerados *borderline*. A monitorização do desempenho permitiu o conhecimento do estado da arte atual e posterior comparação com os pares internacionais.

Bibliografia – 1. Palani et al. External quality assessment of Hb A<sub>2</sub> measurement: data from an Italian pilot study with fresh whole blood samples and commercial HPLC systems. Clin Chem Lab Med 2007;45:68-92

42º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 21-24 Junho 2015 - Rio de Janeiro



**Anexo III: Valor de *Bias* e índice de desvio resultante da participação do laboratório da Unidade de Referência do Departamento de Promoção para a Saúde em ensaios de avaliação externa da qualidade entre 2011 e 2014 no âmbito das hemoglobinopatias**

**A. Hemoglobina A<sub>2</sub>**

<b>Ano</b>	<b>Organizador de ensaio AEQ</b>	<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b><i>Bias</i> HA 8160</b>	<b><i>Bias</i> Variant II</b>	<b>ID HA 8160</b>
2011	PNAEQ	2	A	-9,1	-2,3	
2012	UK-NEQAS	5	3	-2,4	0,0	-0,31
2013	UK-NEQAS	2	2	-7,1	-4,8	-0,95
	UK-NEQAS	4	1	-5,0	0,0	-1,28
	PNAEQ	2	B	-12,6	-3,4	
2014	UK-NEQAS	2	3	0,0	-5,1	-0,51
	UK-NEQAS	5	1	2,4	0,0	-0,32
	PNAEQ	1	A		-2,0	

Tabela 43: Valores de *Bias* e índice de desvio (ID) resultantes do doseamento de Hb A<sub>2</sub> em amostras de controlo elevado ( $\geq 3,5\%$ ) de programas de avaliação externa da qualidade entre 2011 e 2014 nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II

Ano	Organizador de ensaio AEQ	Ensaio	Amostra	Bias HA 8160	Bias Variant II	ID HA 8160
2011	UK-NEQAS	2	2	4,3	0,0	0,47
	UK-NEQAS	2	3	4,2	0,0	0,39
	UK-NEQAS	3	2	4,0	0,0	0,14
	UK-NEQAS	4	1	4,0	0,0	0,65
	UK-NEQAS	4	3	4,2	0,0	0,40
	UK-NEQAS	5	2	0,0	0,0	0,54
	UK-NEQAS	6	1	5,6	0,0	-0,30
	PNAEQ	1	A	0,7	-10,7	
2012	UK-NEQAS	1	1	3,4	0,0	0,46
	UK-NEQAS	1	2	3,8	-3,7	0,52
	UK-NEQAS	2	2	8,0	0,0	0,84
	UK-NEQAS	3	2	22,2	5,3	2,67
	UK-NEQAS	3	3	8,0	4,0	1,14
	UK-NEQAS	4	1	12,5	4,0	1,12
	UK-NEQAS	5	2	13,0	4,3	1,57
	UK-NEQAS	6	1	-3,7	3,7	-0,31
	UK-NEQAS	6	2	0,0	3,7	-0,08
	UK-NEQAS	6	3	-5,9	11,8	-0,38
PNAEQ	2	A	-1,0	-2,3	-0,08	
2013	UK-NEQAS	1	1	0,0	0,0	0,1
	UK-NEQAS	2	3	-3,8	3,8	-0,41
	UK-NEQAS	3	2	0,0	18,8	0,34
	UK-NEQAS	3	3	0,0	9,5	0,22
	UK-NEQAS	4	2	3,7	3,6	-0,59
	UK-NEQAS	5	3	-4,8	0,0	
	UK-NEQAS	6	1	0,0	3,7	-0,06
	UK-NEQAS	6	2	0,0	4,3	-0,25
	PNAEQ	1	A	-6,4	3,6	
	PNAEQ	2	A	-9,7	-16,0	-0,7
2014	UK-NEQAS	1	1	0,0	3,6	-0,39
	UK-NEQAS	1	3	4,5	4,0	-0,43
	UK-NEQAS	2	1	0,0	3,8	-0,29
	UK-NEQAS	3	1		-4,2	
	UK-NEQAS	3	2		0,0	
	UK-NEQAS	4	2		0,0	
	UK-NEQAS	4	2		0,0	
	UK-NEQAS	5	2	0,0	-5,9	-0,66
	UK-NEQAS	6	1	13,0	0,0	1,3
	UK-NEQAS	6	2	13,0	4,2	1,25
	UK-NEQAS	6	3	9,5	0,0	0,87
PNAEQ	2	A	0,3	-3,6	0,05	

Tabela 44: Valores de *Bias* e índice de desvio (ID) resultantes do doseamento de Hb A<sub>2</sub> em amostras de controlo normal (<3,5%) de programas de avaliação externa da qualidade entre 2011 e 2014 nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II

## B. Hemoglobina F

<b>Ano</b>	<b>Organizador de ensaio AEQ</b>	<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>Bias HA 8160</b>	<b>Bias Variant II</b>	<b>ID HA 8160</b>
2011	UK-NEQAS	2	1	16,7	0,0	0,20
	UK-NEQAS	2	3	75,0	-20,0	0,44
	UK-NEQAS	3	1	28,6	0,0	0,43
	UK-NEQAS	3	2	7,1	7,7	0,10
	UK-NEQAS	3	3	11,1	12,5	0,03
	UK-NEQAS	4	1	0,0	0,0	-0,46
	UK-NEQAS	4	2	0,0	50,0	-0,51
	UK-NEQAS	5	1	-50,0	-50,0	-2,26
	UK-NEQAS	5	2	-20,0	-20,0	-0,89
	UK-NEQAS	5	3	-20,0	-25,0	-0,81
	UK-NEQAS	6	2	0,0	0,0	-0,68
	UK-NEQAS	6	3	0,0	0,0	-0,39
		PNAEQ	1	A	0,5	
2012	UK-NEQAS	1	1	0,0	0,0	-0,87
	UK-NEQAS	2	2	0,0	0,0	-0,80
	UK-NEQAS	2	3	-20,0	0,0	-0,93
	UK-NEQAS	3	1	0,0	-16,7	-0,22
	UK-NEQAS	3	3	12,5	-12,5	-0,05
	UK-NEQAS	4	2	-33,3	-16,7	-1,15
	UK-NEQAS	4	3	0,0	0,0	-0,50
	UK-NEQAS	5	1	-57,1	-42,9	-0,37
	UK-NEQAS	5	3	-18,2	-18,2	0,66
	UK-NEQAS	6	1	-50,0	-50,0	-0,67
	UK-NEQAS	6	2	-60,0	-40,0	-0,88
		PNAEQ	1	A	-26,5	-57,1

Tabela 45: Valores de *Bias* e índice de desvio (ID) resultantes do doseamento de Hb F em amostras de controlo normal (< 2,0%) de programas de avaliação externa da qualidade entre 2011 e 2012 nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II

Ano	Organizador de ensaio AEQ	Ensaio	Amostra	Bias HA 8160	Bias Variant II	ID HA 8160
2013	UK-NEQAS	1	1	-50,0	-25,0	-0,62
	UK-NEQAS	1	2	0,0	-14,3	0,00
	UK-NEQAS	1	3	-50,0	-25,0	-0,61
	UK-NEQAS	2	1	-50,0	-25,0	-0,72
	UK-NEQAS	2	2	-11,1	-11,1	-0,47
	UK-NEQAS	3	1	-40,0	-40,0	-0,48
	UK-NEQAS	3	3	-40,0	-40,0	-0,56
	UK-NEQAS	4	1	-10,0	0,0	-0,45
	UK-NEQAS	4	2	-7,7	0,0	-0,44
	UK-NEQAS	4	3	-33,3	0,0	-0,35
	UK-NEQAS	5	1	-33,3	-33,3	-0,50
	UK-NEQAS	5	2	0,0	-28,6	0,00
	UK-NEQAS	6	1	-33,3	-33,3	-0,33
	UK-NEQAS	6	2	-25,0	0,0	-0,19
	UK-NEQAS	6	3	-33,3	0,0	-0,42
	PNAEQ	1	A	-21,3	-2,2	
	PNAEQ	1	B	-50,0	-42,9	
	PNAEQ	2	A	-1,9	2,4	
	PNAEQ	2	B	0,0	-4,9	
2014	UK-NEQAS	1	1	0,0	-25,0	0,00
	UK-NEQAS	1	2	-5,3	5,9	0,00
	UK-NEQAS	2	1	-37,5	0,0	-0,01
	UK-NEQAS	2	2	-33,3	0,0	0,00
	UK-NEQAS	2	3	0,0	-9,1	0,00
	UK-NEQAS	3	1		25,0	0,00
	UK-NEQAS	3	2		4,1	0,00
	UK-NEQAS	3	3		0,0	0,00
	UK-NEQAS	4	1	-28,6	0,0	-0,48
	UK-NEQAS	4	2		0,0	0,00
	UK-NEQAS	4	3		0,0	0,00
	UK-NEQAS	5	1	0,0	0,0	0,00
	UK-NEQAS	5	3	-25,0	0,0	-0,47
	UK-NEQAS	6	1	33,3	0,0	0,55
	PNAEQ	1	A		-11,1	-0,17
	PNAEQ	1	B		-4,3	
	PNAEQ	2	B	28,2	33,3	-0,30

Tabela 46: Valores de *Bias* e índice de desvio (ID) resultantes do doseamento de Hb F em amostras de controlo normal (< 2,0%) de programas de avaliação externa da qualidade entre 2013 e 2014 nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II

<b>Ano</b>	<b>Organizador de ensaio AEQ</b>	<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>Bias HA 8160</b>	<b>Bias Variant II</b>	<b>ID HA 8160</b>
2011	UK-NEQAS	2	2	-3,6	0,0	-0,16
	UK-NEQAS	4	3	-8,2	3,3	-0,38
	UK-NEQAS	6	1	-2,7	10,4	-0,18
	PNAEQ	2	A	-7,1		
2012	UK-NEQAS	1	2	-7,0	3,5	-0,22
	UK-NEQAS	1	3	-10,9		
	UK-NEQAS	2	1	-8,6	3,8	
	UK-NEQAS	3	2	-10,4	-1,4	-0,28
	UK-NEQAS	4	1	-8,3	1,6	-0,29
	UK-NEQAS	5	2	-11,1	-1,9	0,88
	UK-NEQAS	6	3	-11,6	2,6	
	PNAEQ	2	A	-6,5	-4,8	
	PNAEQ	2	B	4,0	0,0	
2013	UK-NEQAS	2	3	-9,3	-2,3	-1,05
	UK-NEQAS	3	2	-11,3	0,8	-2,82
	UK-NEQAS	5	3	-6,9	3,3	-0,87
2014	UK-NEQAS	1	3	-7,8	3,3	-0,70
	UK-NEQAS	5	2	-3,9	8,2	-0,35
	UK-NEQAS	6	2	-1,8	3,4	-0,27
	UK-NEQAS	6	3	0,0	-1,9	0,00
	PNAEQ	2	A	18,3	-4,5	2,95

Tabela 47: Valores de *Bias* e índice de desvio (ID) resultantes do doseamento de Hb F em amostras de controlo elevado ( $\geq 2,0\%$ ) de programas de avaliação externa da qualidade entre 2011 e 2014 nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II

C. Hemoglobina S

<b>Ano</b>	<b>Organizador de ensaio AEQ</b>	<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>Bias HA 8160</b>	<b>Bias Variant II</b>	<b>ID HA 8160</b>
2011	UK-NEQAS	2	1	-16,3	1,0	-2,92
	UK-NEQAS	3	1	-5,9	-1,0	-0,62
	UK-NEQAS	3	1	-5,9	-1,6	-0,20
	UK-NEQAS	4	2	-4,4	-1,5	-0,51
	UK-NEQAS	5	1	-3,5	-2,5	-0,36
	UK-NEQAS	6	2	-43,3	-2,2	-15,65
	UK-NEQAS	6	3	-2,4	-1,3	0,22
2012	UK-NEQAS	1	3		2,4	
	UK-NEQAS	2	1		-2,2	
	UK-NEQAS	2	3	-3,0	-1,6	-0,22
	UK-NEQAS	3	1	-2,1	-0,9	0,06
	UK-NEQAS	4	3	-5,2	0,0	0,14
	UK-NEQAS	5	1	0,3	-0,9	0,05
	PNAEQ	1	A	1,2	-0,6	0,34
2013	UK-NEQAS	1	2	1,4	-1,1	0,30
	UK-NEQAS	1	3		-1,9	
	UK-NEQAS	2	1	-1,1	0,0	-0,22
	UK-NEQAS	3	1	1,9	0,4	0,44
	UK-NEQAS	4	3	-1,5	-4,8	0,25
	UK-NEQAS	5	1	-2,7	-1,3	-0,34
	UK-NEQAS	5	2	-2,9	-1,5	0,17
	PNAEQ	1	B	2,2	-1,1	
2014	UK-NEQAS	1	2	-6,0	-2,2	-0,35
	UK-NEQAS	2	2	-1,9	-0,5	-0,13
	UK-NEQAS	3	3		-4,2	
	UK-NEQAS	4	1	-6,5	-4,0	-0,85
	UK-NEQAS	5	3	-2,5	-0,6	0,23
	PNAEQ	1	B	-3,0	-0,4	-0,12
	PNAEQ	2	B		-3,0	-1,00

Tabela 48: Valores de *Bias* e índice de desvio (ID) resultantes do doseamento de Hb S em amostras de controlo de programas de avaliação externa da qualidade entre 2011 e 2014 nos equipamentos de HPLC HA 8160 e Variant II