

CONTROLO DA QUALIDADE INTERNO E AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE PARA A QUANTIFICAÇÃO DA HbA₂

Filipa Vilhena¹, Filomena Seuanes², Sandra Copeto², Sandra Costa², Helena Correia², Ana Cardoso², Armandina Miranda², Ana Paula Faria²
 Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz¹, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge Lisboa²

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%¹.

A quantificação da Hb A₂ 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 A₂ (4-6%) e diminuição dos índices eritrocitários (VGM e HGM). No entanto, devido à proximidade entre os valores de Hb A₂ normais e patológicos, e aos fenótipos atípicos, com índices eritrocitários próximos do normal e valores de Hb A₂ *borderline* (3,3-3,8%), é muito importante determinações com alto grau de reprodutibilidade e exatidão^{2,3}.

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 A₂ 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 A₂. 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 A₂, por HPLC (HA-8160 e Variant II) e nível de concentração de Hb A₂, 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 ₂ < 3,5%						Hb A ₂ ≥ 3,5%						Média CV	
	Variant II			HA-8160			Variant II			HA-8160			Variant II	HA-8160
	N	Média (%)	CV %	N	Média (%)	CV %	N	Média (%)	CV %	N	Média (%)	CV %		
2011	55	2,4	3,6	117	2,9	1,9	43	5,4	4,0	88	5,6	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
Média	75		3,7	97		2,7	73		3,0	85		2,6	3,4	2,6

Tabela 1: Análise estatística dos resultados das amostras de controlo de Hb A₂ obtidos nos equipamentos HA-8160 e Variant II - 2011-2014.

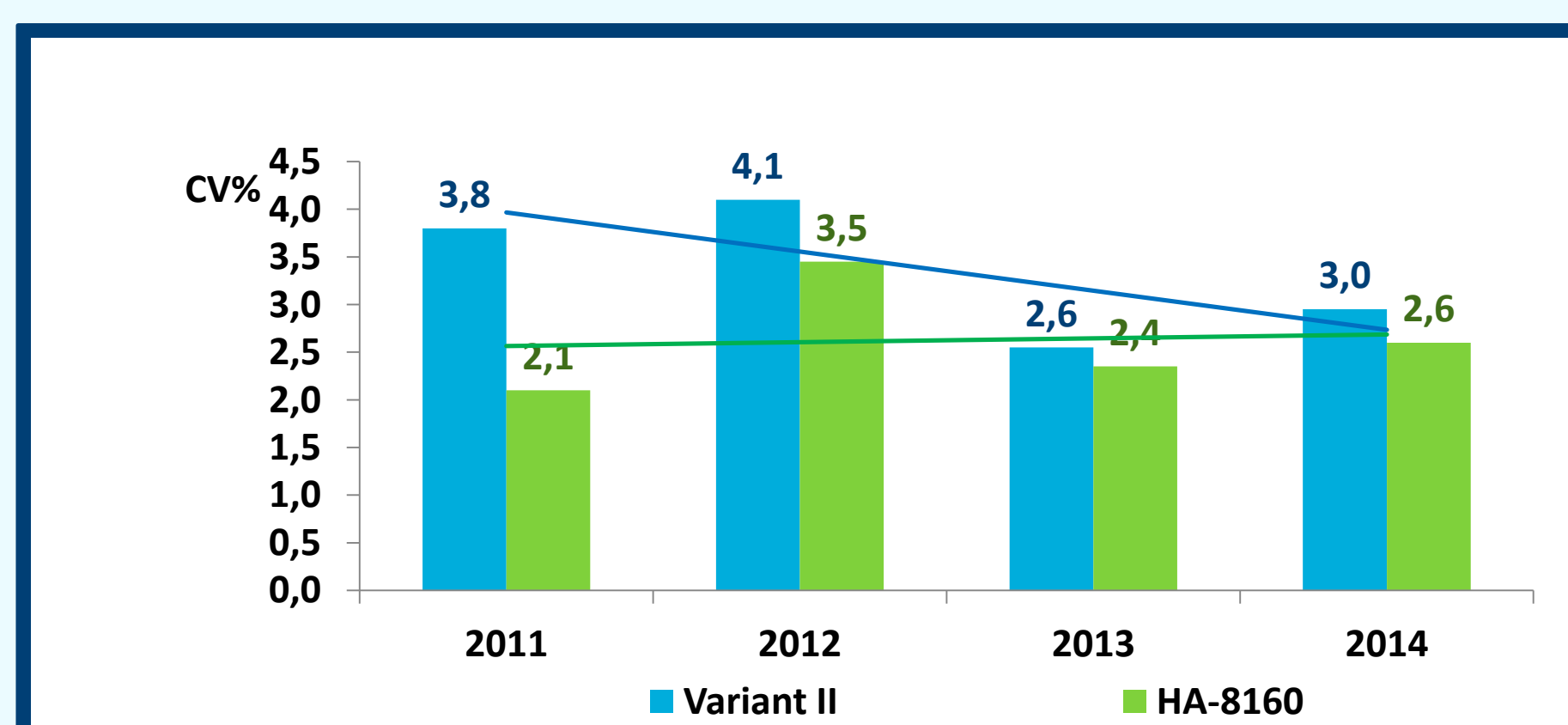


Figura 1: Análise da média dos CV, dos resultados das amostras de controlo de Hb A₂, nos equipamentos HA-8160 e Variant II, 2011-2014.

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).

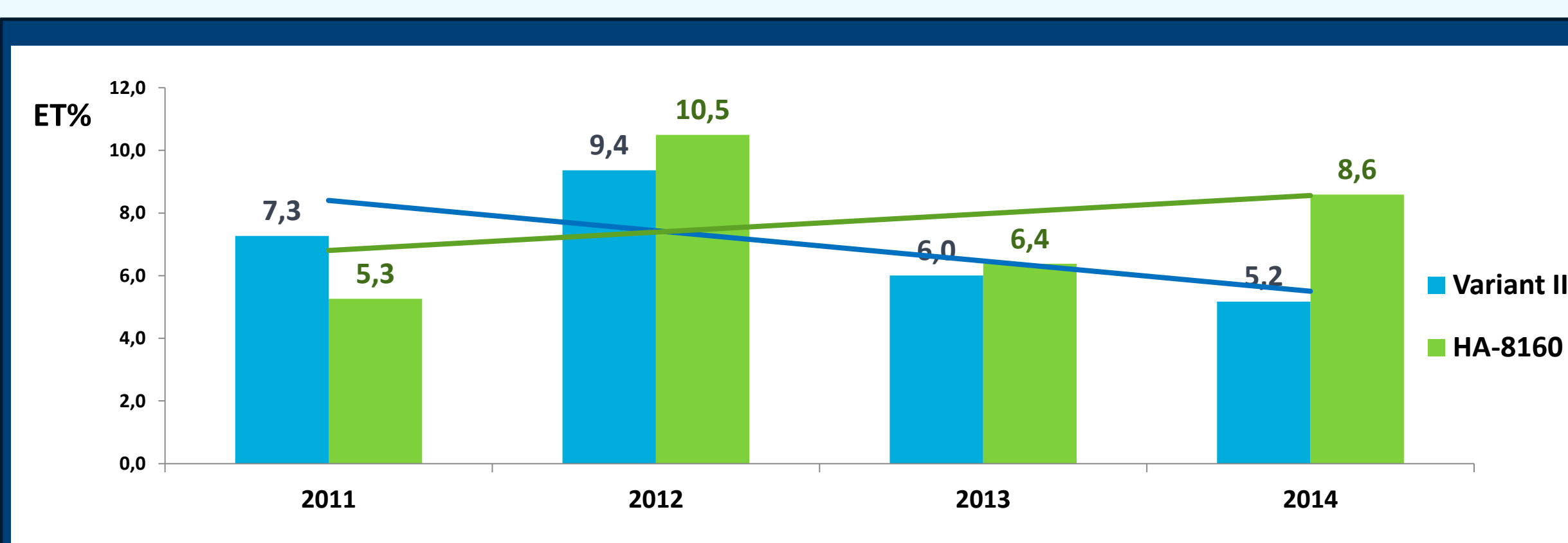


Figura 4: Análise da média anual do Erro Total, dos resultados obtidos na participação em programas de AEQ para a Hb A₂, nos equipamentos HA-8160 e Variant II, 2011-2014.

Avaliação Externa da Qualidade

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

Ano	Hb A ₂ < 3,5%						Hb A ₂ ≥ 3,5%						Média					
	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

Tabela 2: Análise estatística dos resultados da AEQ, da quantificação da Hb A₂, 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).

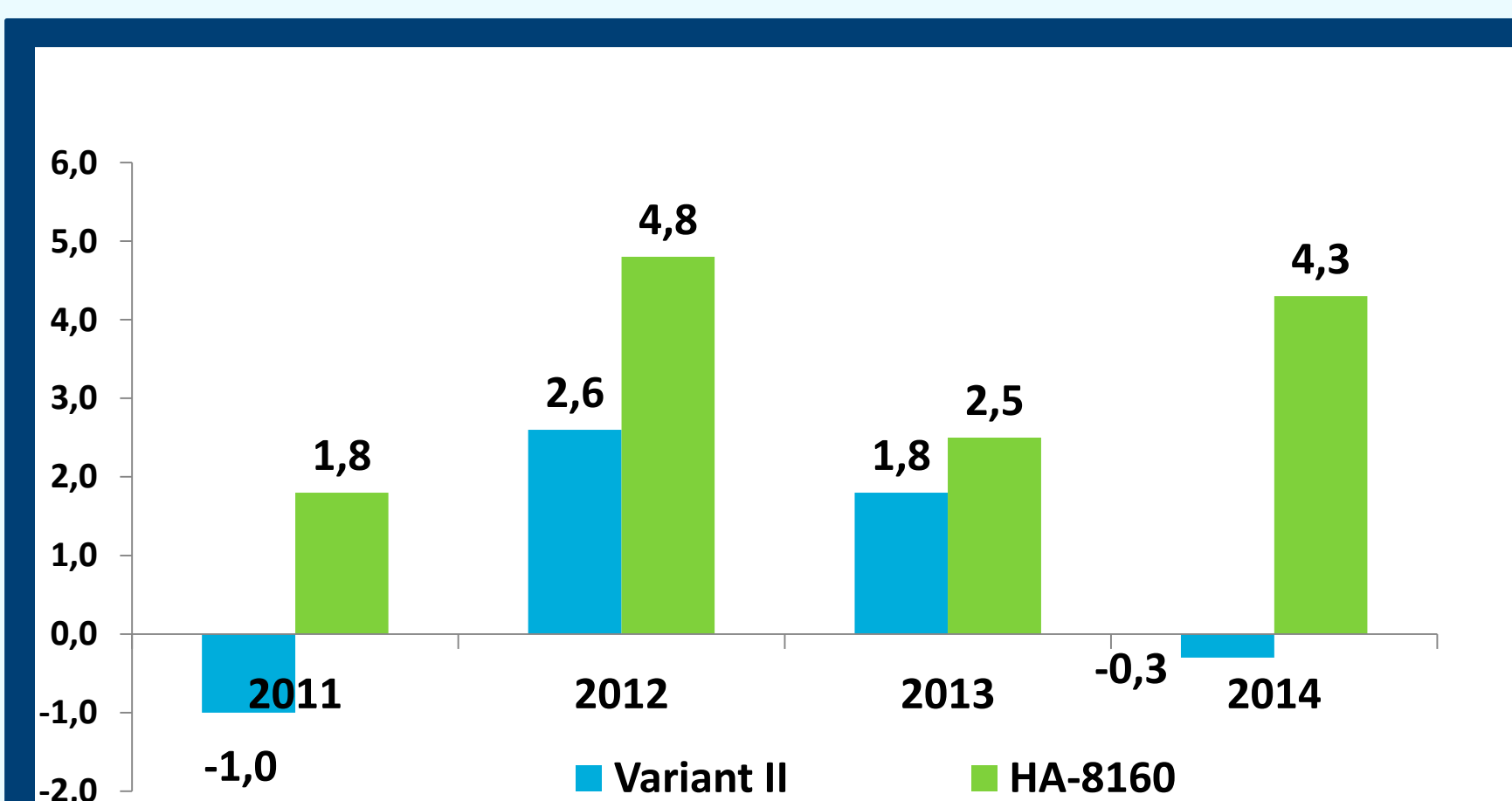


Figura 2: Análise da média anual dos Bias, dos resultados da participação em programas de AEQ para a Hb A₂, nos equipamentos HA-8160 e Variant II, 2011-2014.

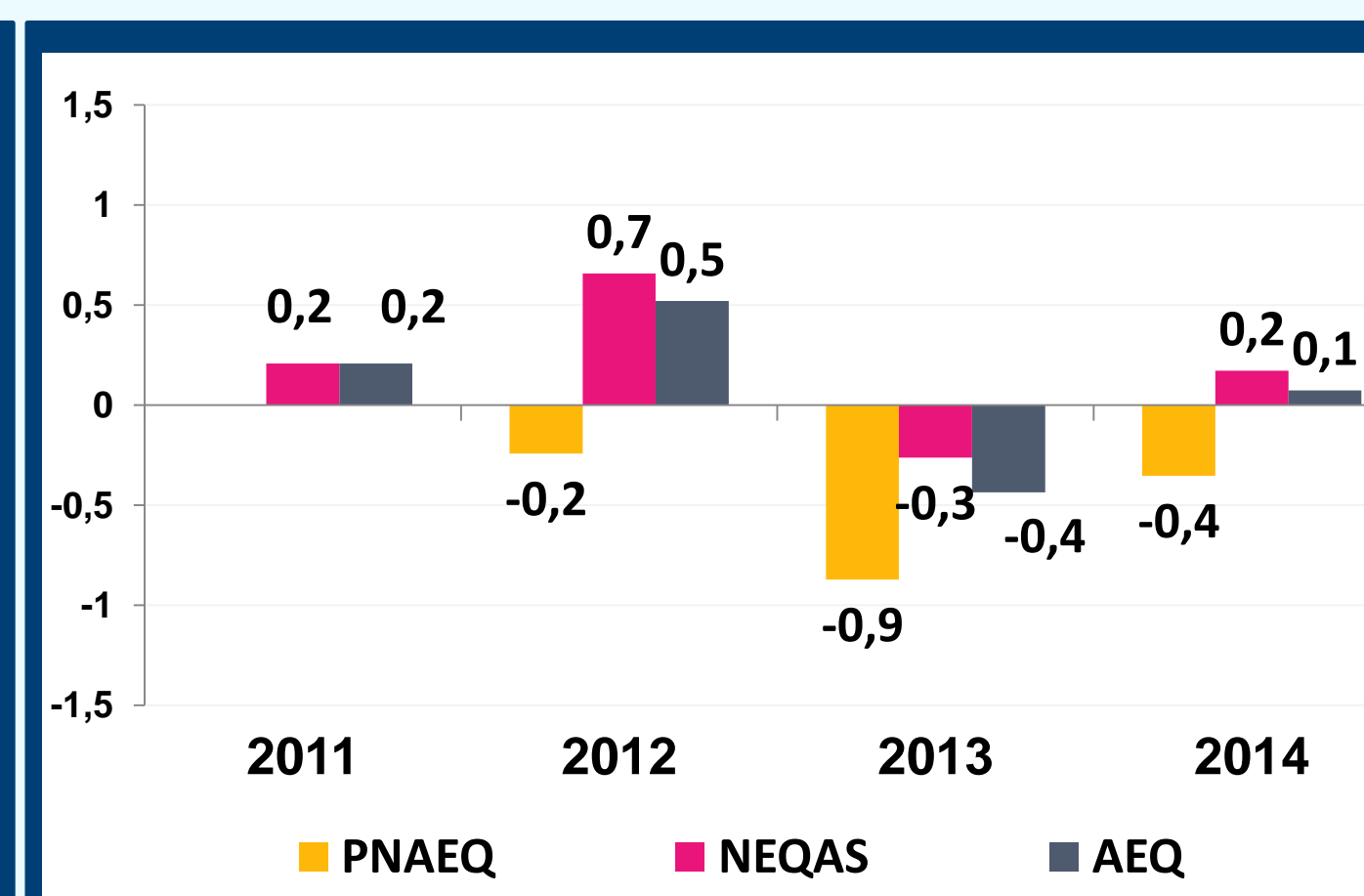


Figura 3: Análise da média anual dos ID, dos resultados obtidos na participação em programas de AEQ para a Hb A₂, nos equipamentos HA-8160 e Variant II, 2011-2014.

O Erro Total anual, para níveis de concentração de Hb A₂ < 3,5% e Hb A₂ ≥ 3,5%, oscilou entre 5,2 e 10,5 (Tabela 2). A média anual do ET, obtida por HPLC, atingiu valores superiores a 9% em 2012, no entanto em 2013 e 2014 já se observa um decréscimo. As médias anuais do ET, para o Variant II, apresentam, no período em estudo uma tendência decrescente, com um valor de 5,2% em 2014.

CONCLUSÃO

Considera-se que as metas analíticas definidas para a Hb A₂, 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 A₂), mantem-se a necessidade de promover uma melhoria contínua no desempenho laboratorial da quantificação da Hb A₂.

Bibliografia:

- Martins M. C. *et al.* Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet* 1993; 30:235-39.
- Renata Paleari *et al.* Journal of Medical Genetics. External quality assessment of Hb A₂ measurement: data from an Italian pilot study with fresh whole blood samples and commercial HPLC. *J Med Genet* 2007; 45(1):88-92.
- Andrea Mosca *et al.* Analytical goals for the determination of Hb A₂. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:88-92. Mosca A, Paleari R e Wild B: Analytical goals for the determination of HbA₂. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(5): 937-41.