



## Diagnóstico da Fibrose Quística – A Prova do Suor como técnica de referência para o seu diagnóstico

Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis e Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde

Doutor Ricardo Jorge

Marta Alvim \*, Alcina Costa \*, Filomena Gomes \*, Suza Almeida \*, Conceição Silva \*\*, Paula Pacheco \*\*

\*Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA, I.P. Lisboa

\*\*Departamento de Genética Humana, INSA, I.P. Lisboa

Email: marta.alvim@insa.min-saude.pt

### Introdução e Objetivo

A Fibrose Quística (FQ) é a doença genética autossómica recessiva letal mais frequente na população caucasiana. É causada por mutações no gene que codifica a proteína CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), que funciona como canal de transporte de iões Cloreto ao nível da membrana apical das células epiteliais, contribuindo para o controlo do movimento de água nos tecidos.

A FQ é caracterizada pela obstrução e infecção pulmonar crónica, insuficiência pancreática, obstrução intestinal, infertilidade masculina e suor com níveis elevados de cloretos.

A idade em que se começam a manifestar os sintomas e a sua gravidade estão relacionadas com o tipo de mutações no gene *CFTR*.

O diagnóstico é baseado no fenótipo clínico associado a duas ou mais provas do suor positivas e/ou pela presença de duas mutações no gene *CFTR*.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a casuística da Prova do Suor entre 2009 e Março de 2018 realizado no Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis do INSA, I.P Lisboa e o estudo do gene *CFTR*, efetuado na Unidade de Genética Molecular, Departamento de Genética Humana, INSA, I.P Lisboa. Foram analisados 594 indivíduos, com idades entre um mês e os 77 anos, sendo que a maioria dos indivíduos, 79,5%, tem até aos 12 anos de idade. Em relação ao género a distribuição da amostragem é aproximada igual, com 43,36% das amostras do sexo feminino e 56,64% do sexo masculino.

### Metodologias

O suor foi obtido por iontoforese com estimulação pela pilocarpina, sendo a colheita efetuada utilizando o sistema - Macroduct®. A análise do suor foi efetuada por Condutimetria (teste de rastreio) no equipamento Wescor Sweat - Chek Analyzer e por Potenciometria Direta (elétrodos seletivos (ISE) ) e a partir de 2015 por Coulimetria através dos equipamentos EML 105 e o analisador de cloretos 926S, respectivamente, para o doseamento do ião cloreto. A metodologia usada para a pesquisa no gene *CFTR* foi ARMS – Amplification Refractory Mutation System; RDB-Reverse Dot-Blot ; DGGE-Denaturing Gradient Electrophoresis dos exões 3,12,13 e 20 e em alguns casos sequenciação do ADN que no seu conjunto permitem detetar cerca de 93 a 98% das mutações associadas à FQ na população portuguesa

### Resultados e Discussão

Nas 594 amostras analisadas por condutimetria, o resultado foi negativo ( $\text{NaCl} < 50 \text{ mmol/L}$ ) em 76,4%, intermédio ( $50 \text{ a } 85 \text{ mmol/L}$ ) em 16,57% e positivo ( $>85 \text{ mmol/L}$ ) em 7,03% das amostras (Fig. 2). Verifica-se uma grande percentagem de resultados negativos provavelmente devido a dificuldade de diagnóstico através da sintomatologia clínica, que leva a pedidos de rastreio desta patologia para excluir possíveis diagnósticos da FQ.

Foram analisadas 230 amostras para o ião cloreto, sendo 170 amostras (68,33%) consideradas negativas com  $\text{Cl}^- < 40 \text{ mmol/L}$ , 30 intermédias ( $16,13\%$ ) com  $\text{Cl}^-$  entre 40 e 60  $\text{mmol/L}$  e 30 amostras positivas com  $\text{Cl}^- > 60 \text{ mmol/L}$  (Fig.3). Tal como era expectável o número de amostras positivas no doseamento do ião cloreto (15,54%) foi superior ao número encontrado na metodologia de rastreio (6,38%). Como tal, é fundamental chamar a atenção para a importância da análise do ião cloreto, sendo insuficiente a análise apenas por condutimetria para confirmar o diagnóstico da FQ.

Todas as amostras positivas para NaCl que foram analisadas por coulometria/potenciometria confirmaram a sua positividade. Dos resultados intermédios para o NaCl obtivemos 37,2% das amostras com valor intermédio para o ião cloreto. Nestes casos foi recomendada uma nova colheita para a Prova do Suor e/ou a pesquisa de mutações no gene *CFTR*. Dos restantes resultados intermédios para o NaCl, apenas 8,1% foram positivos para o ião cloreto, enquanto 54,7% foram negativos para o ião cloreto. Nesses casos o clínico deve avaliar a sintomatologia para excluir o diagnóstico de FQ.

O doseamento do ião cloreto (coulometria/potenciometria) permite obter resultados mais conclusivos (15,54% positivos, 16,13% intermédios e 68,33 % negativos) do que a condutimetria (6,38% positivos, 17,22% de intermédios e 76,4% de negativos), tal como era expectável para um teste de confirmação, sendo a condutimetria considerado um teste de O estudo do gene *CFTR* foi efetuado em 44 casos dos quais 14 (32%) tinham uma mutação, 12 (27%) apresentaram duas mutações e em 18 (41%) não apresentaram mutações. (Fig. 4).

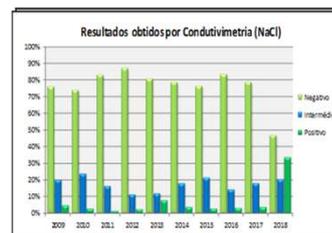


Figura 2 – Resultados do NaCl por Condutimetria



Figura 3 – Resultados do Cl por Coulimetria/Potenciometria

### Resultado do estudo do gene CFTR



Figura 4 – Resultados da pesquisa de mutações no gene CFTR

Em todas as amostras positivas para o ião cloreto que foram estudadas para o gene *CFTR* foram detetadas mutações, exceto num caso de um bebé com menos de 6 meses. Em 72,8% das amostras consideradas intermédias para o ião cloreto não foram detetadas mutações; das restantes amostras, apenas uma apresentou duas mutações. Esse doente apresentava um resultado intermédio para a prova do suor, mas devido a sintomatologia sugestiva de FQ fez a pesquisa de mutações no gene *CFTR*, e a presença de duas mutações veio confirmar esse diagnóstico.

Em todas as amostras estudadas para o gene *CFTR* em crianças com menos de 6 meses de idade que apresentavam hipotonia, aconselhou-se o acompanhamento em consulta da especialidade e posterior repetição das análises pois ao nível das análises laboratoriais (prova do suor e pesquisa de mutações) não foi possível confirmar o diagnóstico de FQ.

### Conclusão

A prova do Suor, com doseamento de Cloretos é considerada a prova de referência para o diagnóstico da FQ e é diagnóstico em aproximadamente 98% dos casos. É fundamental que esta análise seja realizada, desde a colheita até à interpretação dos resultados, por técnicos especializados e experientes de forma a garantir resultados fiáveis e conclusivos. A interpretação do resultado deve dar uma precisa indicação ao clínico e, nos casos em que isso não for possível, o laboratório deve aconselhar uma repetição posterior da análise e/ou pesquisa de mutações no gene *CFTR*. Este procedimento tem como finalidade a confirmação do diagnóstico o mais atempadamente possível, a qual é muito importante para permitir uma maior eficácia no tratamento e/ou acompanhamento dos doentes, que na maioria dos casos são crianças.

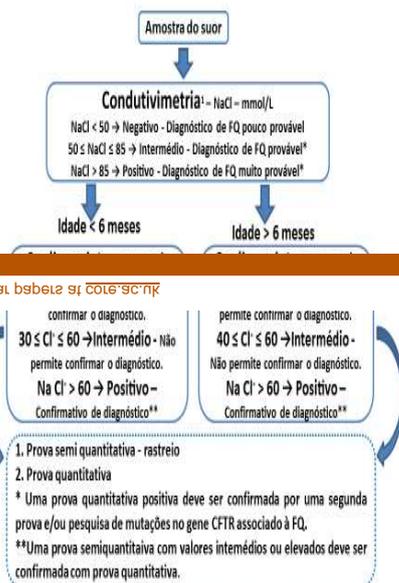


Figura 1 – Algoritmo clínico

O procedimento utilizado para a realização do Teste do Suor é baseado na Norma 031/2012 atualizada em 10/01/2014 da DGS., que remete para as “Guideline for the performance of the sweat test for the investigation of Cystic Fibrosis in the UK v2, November 2003, and Evidence based guideline March 2014”. (Fig 1)

O laboratório efetua controlo interno da qualidade (CV =1,59%) e participa na Avaliação externa da qualidade UK NEQAS-Sweat testing.

### Bibliografia

- Norma da Direção Geral da Saúde nº 031/2012 atualizada 30/07/2015, Diagnóstico da Fibrose Quística em idade pediátrica e no adulto.
- Philip M. Farrell et al “Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report” *J Pediatr.* 2008 August ; 153(2): S4-S14
- Vivry A. LeGrys, Dra, James R. Yankansas, MD, Lynne M. Quintell, MD, Bruce C. Marshall, MD and Peter J. Mogayzel, Jr, MD, PhD. - Diagnostic Sweat Testing: The Cystic Fibrosis Foundation Guidelines *J Pediatr* 2007; 151: 85-9.
- Carlo Castellani, Kevin W Southen, Keith Brownlee, Jeannette Dankerl Roelke, Alistair Duff, Michael Farrell, Anil Mehta, Anne Mink and other authors - European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *Journal of Cystic Fibrosis* 8 (2009) 153,173.