

Prova do Suor no Diagnóstico Laboratorial da Fibrose Quística

Casística da Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência (UDR) do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis

Alcina Costa*, Lídia Batalha*, Suza Almeida* Arminda Vilares*, Paula Pacheco**, Conceição Silva **, Armandina Miranda*

*Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPS), INSA, I.P. Lisboa

**Unidade de Genética Molecular, Departamento de Genética Humana, INSA, I.P. Lisboa

Email: alcina.costa@insa.min-saude.pt

INTRODUÇÃO

A Fibrose Quística (FQ) é a doença genética autossômica 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 tecidos¹. A FQ é caracterizada pela obstrução e infeção pulmonar crónica, insuficiência pancreática e obstrução intestinal, infertilidade masculina, e suor com níveis elevados de cloretos. A doença é multissistémica e afeta todos os órgãos que expressam a CFTR^{1,2}. A idade em que se começam a manifestar os primeiros sintomas e a sua gravidade estão relacionados 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*^{3,4}. O teste laboratorial de referência para o diagnóstico da FQ é a prova do suor, com base na concentração elevada de iões cloreto no suor.

OBJETIVO

Apresentar a casística da Prova do Suor, no período de 2009 a 2013 da UDR do DPS 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.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas 472 provas do suor, na rotina laboratorial, A idade dos utentes variou dos 3 meses aos 83 anos, sendo a mediana de 4 anos e o terceiro quartil de 10 anos; 276 (58,5%) indivíduos do sexo masculino e 196 (41,5%) do sexo feminino.

O suor foi obtido por iontoforese com estimulação pela pilocarpina (Fig.1). A colheita foi efetuada utilizando o sistema - Macroduct®. (Fig. 2). A análise do suor foi efetuada por condutimetria (teste de rastreio) usando o equipamento Wescor Sweat - Chek Analyzer (Fig. 3) e por Potenciometria Direta (elétrodos seletivos - doseamento dos iões cloreto), usando o equipamento EML 105 (Fig.4). A pesquisa de mutações no gene *CFTR* foi realizada utilizando as técnicas de rotina do laboratório (*ARMS-Amplification Refractory Mutation System*; *RDB-Reverse Dot-Blot*; *DGGE-Denaturing Gradient Gel 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.



Figura 1- Indutor do suor



Figura 2- Macroduct



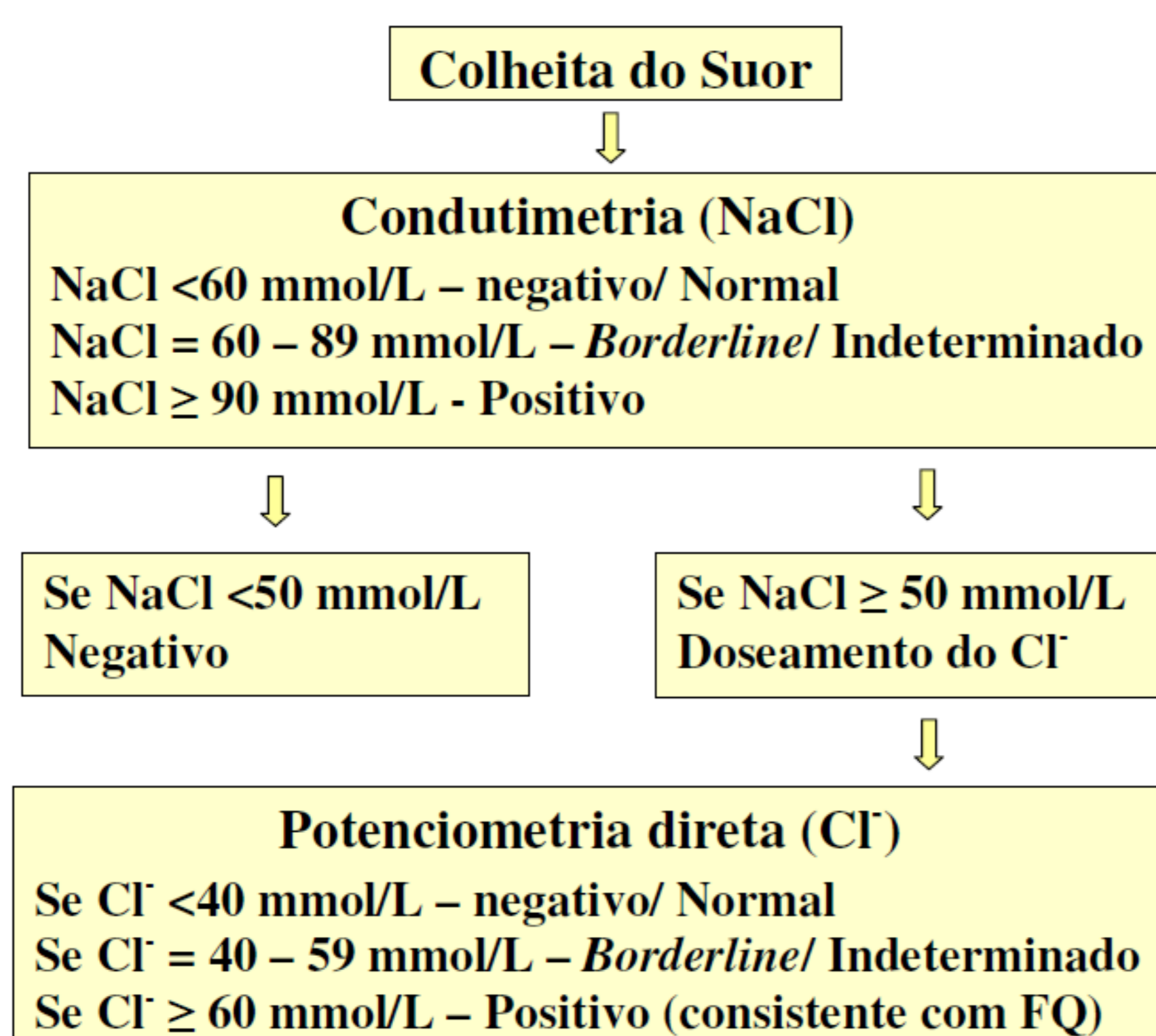
Figura 3- Condutivimetro



Figura 4- Potenciómetro

O Procedimento Laboratorial utilizado para a realização da Prova do Suor é baseado em: "Guideline for the performance of the sweat test for the investigation of Cystic Fibrosis in the UK", November 2003 e "Sweat testing: Sample collection and quantitative analysis- Second Edition." C34-A2, vol 20 nº 14 da NCCLS e Norma 31/2012 atualizada em 10/01/2014 da DGS.

Algoritmo Laboratorial



O laboratório efetua controlo interno da qualidade (CV =1,49%) e participa na Avaliação Externa da Qualidade UK NEQAS-Sweat testing.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 — Resultados da prova do suor por condutimetria (NaCl)

| Ano | Nº teste | Negativo Nº (%) | "Borderline" Nº (%) | Positivo Nº (%) |
|-------|----------|-----------------|---------------------|-----------------|
| 2009 | 112 | 85 (75.9%) | 25 (22.3%) | 2 (1.8%) |
| 2010 | 116 | 85 (73.3%) | 28 (24.1%) | 3 (2.6%) |
| 2011 | 100 | 83 (83.0%) | 16 (16.0%) | 1 (1.0%) |
| 2012 | 92 | 80 (87.0%) | 10 (10.9%) | 2 (2.2%) |
| 2013 | 52 | 42 (80.8%) | 6 (11.5%) | 4 (7.7%) |
| Total | 472 | 375 (79.4%) | 85 (18.0%) | 12 (2.5%) |

Tabela 2 Resultados da prova do suor por potenciometria direta (ião cloreto)

| Resultados por Condutimetria | Nº de amostras | Resultados por Potenciometria Direta (Cl ⁻) | | |
|------------------------------|----------------|---------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|
| | | Negativo Nº (%) | Borderline Nº (%) | Positivo Nº (%) |
| NaCl < 50 mmol/L | 40 | 40 | 0 | 0 |
| NaCl ≥ 50 mmol/L | 75 | 32 (42.7%) | 24 (32.0%) | 19 (25.3%) |
| Total | 115 | 72 | 24 | 19 |

Das 472 amostras analisadas por condutimetria, o resultado foi negativo (NaCl < 50 mmol/L) em 375 (79,4%), positivo (≥ 90 mmol/L) em 12 (2,5%) e *borderline* (50 a 89 mmol/L) em 85 (18,0%) (Tab. 1). Verifica-se uma diminuição do número de pedidos de provas do suor de 2012 para 2013, provavelmente devido a um maior controlo das condições clínicas sugestivas de FQ. Esta observação é corroborada pelo facto de a proporção de casos positivos ser superior aos observados nos anos anteriores.

A análise por potenciometria direta para doseamento do ião Cl⁻, foi realizada em 115 (24,4%) amostras, 75 cujos resultados por condutimetria, foram ≥ 50 mmol/L e 40 com pedido específico de doseamento quantitativo de cloretos (Tab 2). O resultado foi negativo em 72 (62,6%) amostras, *borderline* em 24 (20,9%) e positivo em 19 (16,5%).

Das 75 amostras analisadas por potenciometria, com valor de NaCl ≥ 50 mmol/L, 32 (42,7%) foram negativas, 24 (32,0%) *borderline* e 19 (25,3 %) positivas. A totalidade das amostras com resultado de NaCl < 50 mmol/L foi negativa no doseamento de cloretos (Cl⁻ < 40 mmol/L)

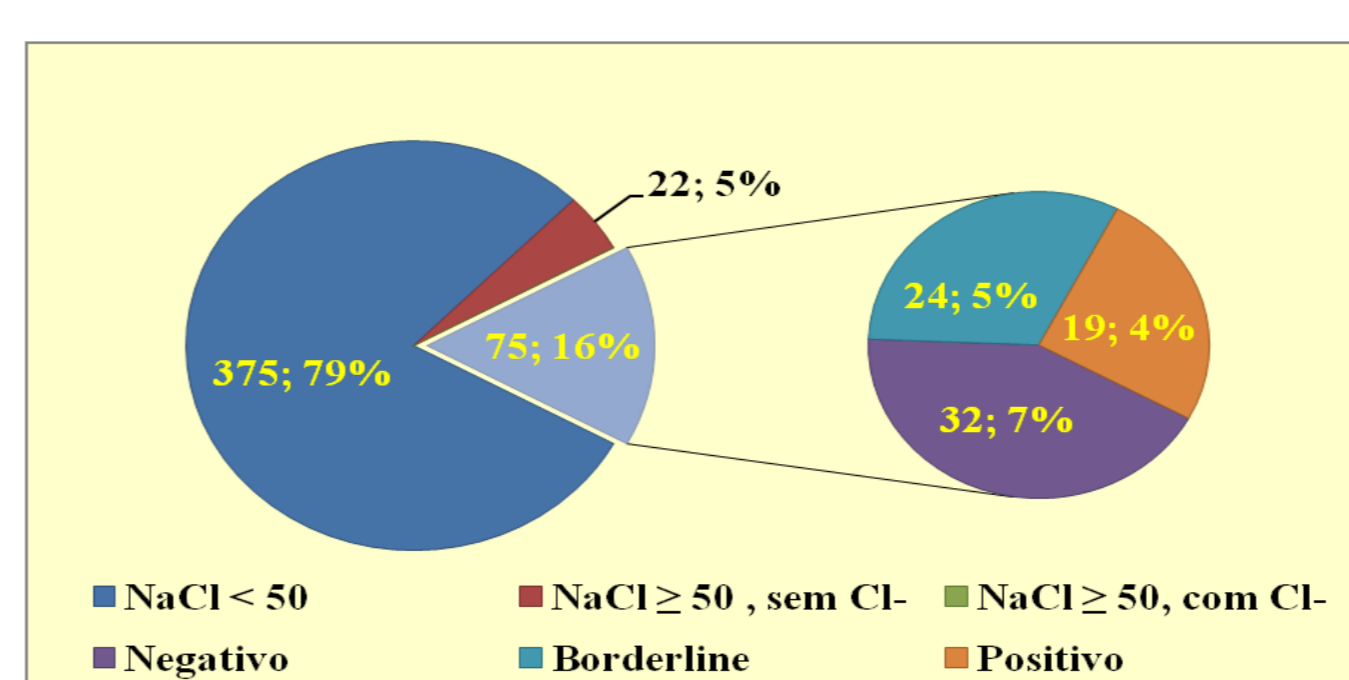


Figura 5 - Percentagem de resultados positivos, borderline e negativos para o rastreio (condutimetria) e confirmação (potenciometria) relativamente ao total de amostras analisadas

Das 472 amostras, 375 (79%) que apresentaram resultado por condutimetria (NaCl < 50 mmol/L), saíram com resultado negativo. Com resultado positivo ou *borderline* obtivemos 97 casos, no entanto em 22 não foi efetuado o doseamento quantitativo do ião cloreto, por insuficiência de amostra.

Nos 75 casos analisados por potenciometria, o doseamento do ião cloreto confirmou, 19 positivos, 24 *borderline* e 32 negativos, correspondendo a 4 %, 5 % e 7% do total das amostras estudadas, respetivamente (Fig. 5).

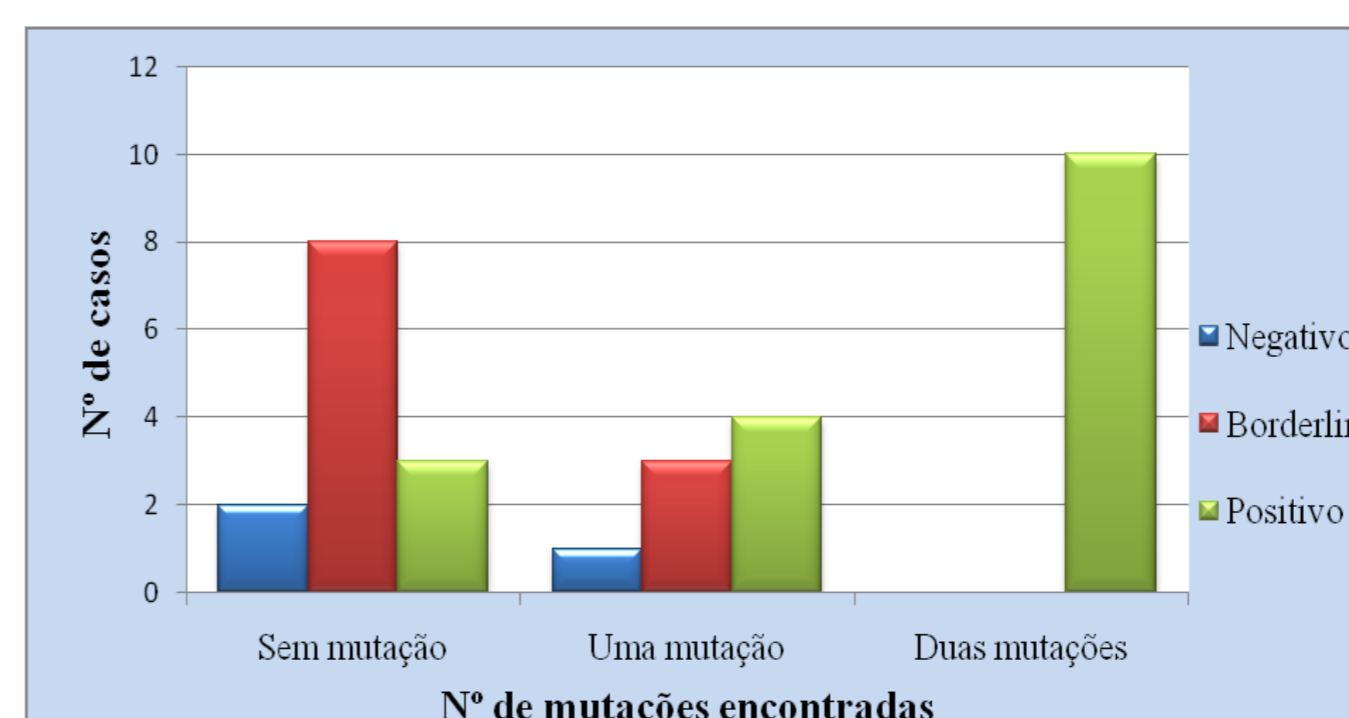


Figura 6 – Relação entre o resultado da prova do suor e o número de mutações encontradas

O estudo do Gene *CFTR* foi efetuado em 31 casos, 15 com resultado de cloretos positivo, 11 *borderline* e 3 negativos (um caso de uma criança com 6 meses de idade, na qual foi encontrada uma mutação); e 2 com resultado de condutimetria *borderline* (50 a 89 mmol/L, que por insuficiência de amostra não foi realizado o doseamento de cloretos), nas quais não foram detetadas mutações.

Nos 31 casos estudados para o gene *CFTR*, em 10 (32%) foram identificadas duas mutações, em 8 (26%) uma mutação, e nos restantes 13 (42%), não se encontraram mutações (Fig. 6).

CONCLUSÃO

Uma prova do suor precisa depende da coordenação exata de muitos elementos. A prova é tecnicamente exigente, requer experiência, qualificação e o seguimento de orientações emitidas por organismos de referência. A sua interpretação e valorização são de importância primordial para o diagnóstico correto e atempado, sendo no entanto essencial utilizar os métodos de colheita e análise apropriados, assim como um adequado controlo de qualidade e avaliação dos resultados. Todos os casos em que foram identificadas duas mutações no gene *CFTR* apresentaram uma prova do suor positiva. A prova do suor com base na concentração de cloretos é o teste de referência para o diagnóstico da FQ.

Bibliografia

- Accurso FJ. "Update in cystic fibrosis" (2006). *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 754-7.
- Avantika Mishra, Ronda Greaves, John Massie. The Relevance of Sweat Testing for the diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era"; *Clin Biochem Ver* Vol 26, November 2005
- Rosenstein B, Cutting G. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998;132:589-95. [PubMed: 9580754]
- 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