

## Fibrose quística: diagnóstico laboratorial pela prova do suor num grupo populacional

Alcina Costa<sup>1</sup>, Lídia Batalha<sup>1</sup>, Suza Almeida<sup>1</sup>, Arminda Vilares<sup>1</sup>, Paula Pacheco<sup>2</sup>, Conceição Silva<sup>2</sup>, Armandina Miranda<sup>1</sup>

alcina.costa@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

(2) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, INSA.

### Introdução

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 (1). 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 do ião cloreto no suor.

### Objetivo

Caraterizar o grupo de utentes que realizaram uma prova do suor e o estudo do gene CFTR para diagnóstico laboratorial da fibrose quística, respetivamente no Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis e no Departamento de Genética Humana, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no período de 2009 a 2013.

### Metodologia

O suor foi obtido por iontoforese com estimulação pela pilocarpina e colhido utilizando o sistema Macroduct®. A análise do suor foi efetuada por condutimetria (teste de rastreio) e por potenciometria direta (elétrodos seletivos - doseamento do ião cloreto). 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 alargamento de estudo com análise por sequenciação ou DGGE dos exões 1, 4, 5, 6, 14, 17, 19 e 22) que no seu conjunto permitem detetar cerca de 93 a 98% das mutações associadas à FQ na população portuguesa.

O procedimento laboratorial utilizado para a realização da prova do suor é baseado nas normas “Guideline for the performance of the sweat test for the investigation of Cystic Fibrosis in the UK” (november 2003), “Sweat testing: Sample collection and quantitative analysis; Approved Guideline – Second Edition” (NCCLS document C34-A2, june 2000) e Norma da DGS nº 31/2012 de 28/12/2012 (atualizada a 10/01/2014) e segue uma marcha analítica (Figura 1). O laboratório efetua controlo interno da qualidade (CV =1,49%) e participa na Avaliação Externa da Qualidade UK NEQAS-Sweat testing.

### Casuística no âmbito da prova do suor e pesquisa de mutações no gene CFTR

No período de 2009 a 2013 foram realizadas 472 provas do suor, no âmbito da rotina laboratorial. A idade dos utentes variou entre os 3 meses e os 83 anos, sendo a mediana de 4 anos e o terceiro quartil de 10 anos. Neste grupo 276 (58,5%) indivíduos eram do sexo masculino e 196 (41,5%) do sexo feminino.

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%). Verifica-se uma diminuição do número de pedidos de provas do suor de 2012 para 2013, provavelmente devido a um maior controlo das condições

artigos breves\_ n. 6

clínicas sugestivas de FQ. Esta observação é corroborada pelo facto de a proporção de casos positivos ser superior aos observados nos anos anteriores (Tabela 1).

Figura 1: Algoritmo laboratorial da prova do suor.

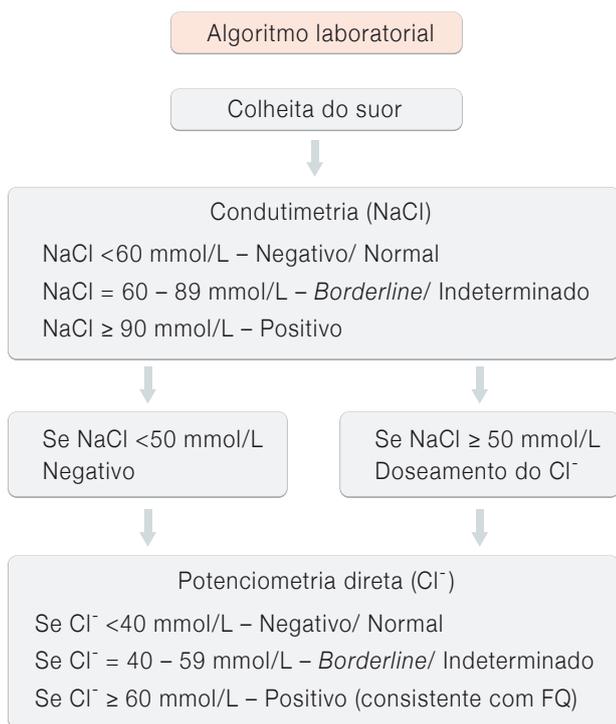


Tabela 1: Resultados da prova do suor por conductimetria (NaCl).

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%)

A análise por potenciometria direta para doseamento do ião  $Cl^-$  foi realizada em 115 (24,4%) amostras, 75 cujos resultados por conductimetria foram  $\geq 50$  mmol/L e 40 com pedido específico de doseamento quantitativo do ião  $Cl^-$ . O resultado foi negativo ( $Cl^- < 40$  mmol/L) em 72 amostras (62,6%), *borderline* ( $40$  mmol/L  $< Cl^- < 59$  mmol/L) em 24 amostras (20,9%) e positivo ( $Cl^- \geq 60$  mmol/L) em 19 amostras (16,5%). Das 75 amostras analisadas por potenciometria, com valor de NaCl  $\geq 50$  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 do ião  $Cl^-$  (Tabela 2).

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

Resultados por conductimetria (NaCl)	Nº de amostras	Resultados por potenciometria direta ( $Cl^-$ )		
		Negativo Nº (%)	Borderline Nº (%)	Positivo Nº (%)
NaCl $< 50$ mmol/L	40	40	0	0
NaCl $\geq 50$ mmol/L	75	32 (42,7%)	24 (32,0%)	19 (25,3%)
Total	115	72	24	19

Do total de 472 amostras, 375 (79%) cujo resultado por conductimetria foi inferior a 50 mmol/L, saíram como negativas. Com resultado positivo ou *borderline* obtivemos 97 casos, no entanto em 22 não foi efetuado o doseamento quantitativo do ião  $Cl^-$ , por insuficiência de amostra. Nos 75 casos analisados por potenciometria, o doseamento do ião  $Cl^-$  confirmou 19 positivos, 24 *borderline* e 32 negativos, correspondendo a 4 %, 5 % e 7% do total das amostras estudadas, respetivamente (Gráfico 1).

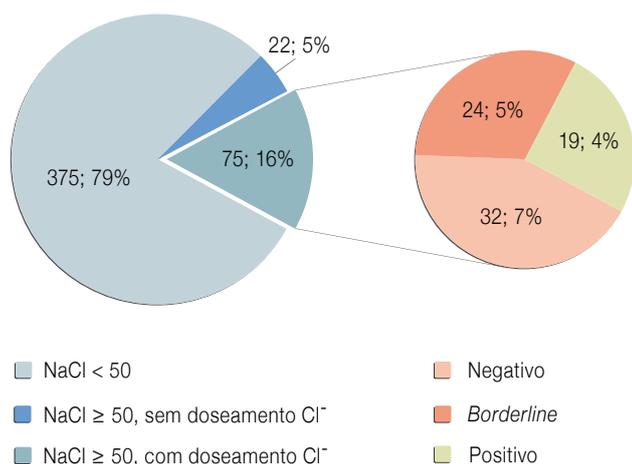
O estudo do gene *CFTR* foi efetuado em 31 casos: 15 com resultado de análise de ião  $Cl^-$  positivo, 11 *borderline* e 3 negativos, e ainda em 2 casos com resultado de conductimetria *borderline* (50 a 89 mmol/L), em que por insuficiência de amostra não foi possível realizar o teste confirmatório por potenciometria, e nos 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

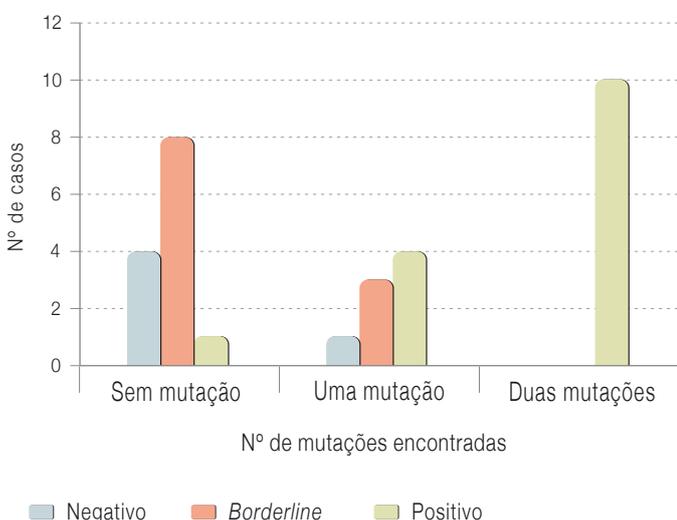
artigos breves\_ n. 6

13 (42%) não se encontraram mutações (*Gráfico 2*). Nos 10 casos em que foram encontradas duas mutações, a prova do suor foi positiva. Dos 8 casos em que foi detetada uma mutação, 4 (50%) tinham prova de suor positiva, 3 (37,5%) *borderline* e 1 (12,5%) prova de suor negativa. Dos 13 casos em que não se encontraram mutações, 3 (23,1%) tinham prova de suor positiva, 8 *borderline* (61,5%) e 2 (15,4%) negativa, indicando a particular importância de uma correlação com os dados clínicos, assim como a repetição da prova.

**Gráfico 1:** Percentagem de resultados positivos, *borderline* e negativos para o rastreio (condutimetria) e confirmação (potenciometria) relativamente ao total de amostras analisadas.



**Gráfico 2:** Relação entre o resultado da prova do suor e o número de mutações encontradas.



**\_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. Por outro lado, nos doentes com provas de suor consistentemente positivas em que não são encontradas 2 mutações associadas à FQ, é recomendável fazer um alargamento do estudo genético, de modo a confirmar o diagnóstico de FQ. De notar ainda que alguns portadores de FQ (com um gene normal e um gene mutado) podem ter testes de suor com valores *borderline* pelo que a prova de suor deverá ser repetida. A prova do suor com base na concentração do ião cloreto é o teste de referência para o diagnóstico da FQ, devendo ser realizada antes da análise genética.

**Referências bibliográficas:**

- (1) Accurso FJ. Update in cystic fibrosis 2006. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(8):754-7. [LINK](#)
- (2) Mishra A, Greaves R, Massie J. The Relevance of Sweat Testing for the diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era. Clin Biochem Rev. 2005;26(4):135-53. [LINK](#)
- (3) Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. J Pediatr. 1998;132(4):589-95.
- (4) Farrell PM1, Rosenstein BJ, White TB, et al Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr. 2008;153(2):S4-S14. [LINK](#)