

# Prova do Suor no Diagnóstico Laboratorial da Fibrose Quística

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

Alcina Costa

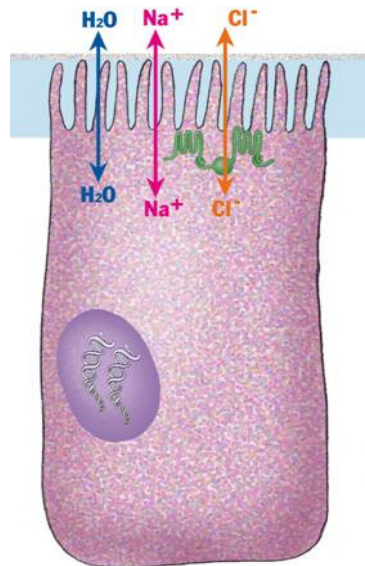
11 Julho 2014



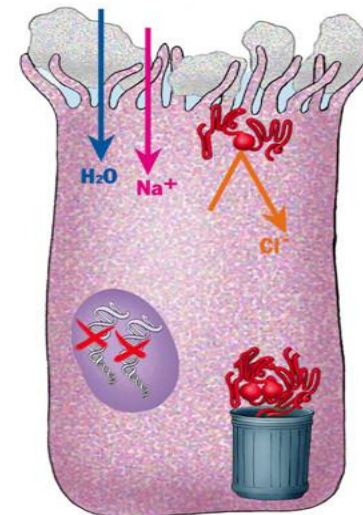
# Fibrose quística

- Fibrose Quística (FQ) - doença monogénica autossómica recessiva . Mais frequente na população caucasiana
- Causada por mutações no gene que codifica a proteína CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*).
- A CFTR 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. Secreta cloretos e inibe reabsorção de sódio.

# Fibrose quística



Sem FQ



Com FQ

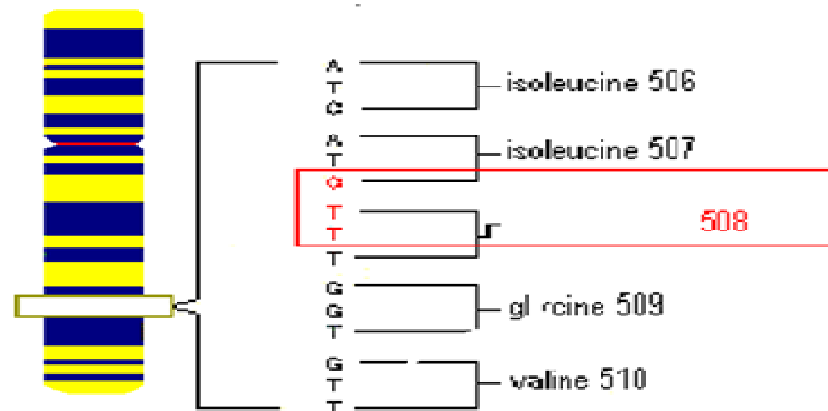
Disfunção da proteína CFTR - distúrbio do transporte de cloro através dos epitélios. Influxo compensatório de sódio para manter a eletroneutralidade com conseqüente influxo da água, o que leva á desidratação da superfície celular, com formação do muco espesso característico da doença

# Gene *CFTR*

- O gene da FQ localiza-se no braço longo do cromossomo 7, no locus q31, formado por 250Kb de DNA, com 27 exões e codifica um RNAm de 6,5Kb.
- Descritas mais de 1600 mutações no gene *CFTR*

A mais frequente é a deleção de três pares de bases no exão 10 do gene, com perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína. Conhecida como mutação  $\Delta F508$ .

Presente em cerca de 42% do gene FQ da população portuguesa



# Fibrose quística

- 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
- 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*

# Fenótipo clínico de Fibrose quística

Período neonatal / 1º ano de vida	Idade pré-escolar / Escolar	Adolescente / Adulto
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Íleus Meconial</li> <li>• Icterícia Prolongada</li> <li>• Hipoproteinémia/edema</li> <li>• Má progressão estatura-ponderal</li> <li>• Esteatorreia</li> <li>• Diarreia Crónica</li> <li>• Bronquiolite</li> <li>• Bronquite</li> <li>• Hiponatrémia</li> <li>• Golpe de calor</li> <li>• Prolapso retal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tosse persistente com ou sem expectoração</li> <li>• Pieira recorrente</li> <li>• Hipocratismo digital</li> <li>• Má progressão estatura-ponderal</li> <li>• Hepatomegália ou doença hepática</li> <li>• Diarreia Crónica</li> <li>• Prolapso retal</li> <li>• Doença pulmonar crónica supurativa</li> <li>• Asma com infeções e alterações radiológicas</li> <li>• SOID*</li> <li>• Polipose nasal</li> <li>• Sinusopatia crónica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Doença pulmonar crónica supurativa</li> <li>• DM** com sintomatologia pulmonar</li> <li>• Cirrose biliar focal ou multilobular</li> <li>• Pancreatite idiopática crónica</li> <li>• Atraso na puberdade</li> <li>• Infertilidade masculina por azoospermia</li> <li>• Fertilidade feminina diminuída</li> </ul>

\*SOID: Síndrome de Obstrução Intestinal Distal; DM\*\* :Diabetes Mellitus.

Barreto, C. Fibrose Quística, in: Marques Gomes MJ, Sotto-Mayor R. Tratado de Pneumologia. Permanyer Portugal, 2003, Vol. 1;927-943).

# Epidemiologia

Population and prevalence of patients with CF in E.U. countries

	Population in 2004 (thousands)	# CF patients	CF prevalence (per 10,000)	Estimated CF incidence	Source(s)
Austria	8,175	686	0.839	1:3 500	Ia, [1]
Belgium	10,348	1065	1.03	1:2850	Ib, IIa, [13,14]
Bulgaria	7,518	170	0.226	1:2500	[13]
Cyprus	776	26	0.335	1:7914	[15]
Czech Republic	10,246	570	0.556	1:2833	Ic, IIa, [14,16]
Denmark	5,413	412	0.761	1:4700	IIa, [14,17,18]
Estonia	1,342	83	0.618	1:4500	[17]
Finland	5,215	64	0.123	1:25000	Id, [17,19]
France	60,424	4533	0.750	1:4700	Ie, IIa, IIe, [1]
Germany	82,425	6835 <sup>a</sup>	0.829 <sup>a</sup>	1:3300	If, IIa, [14,16,20]
Greece	10,648	555	0.521	1:3500	Ig, [14]
Hungary	10,032	410	0.409		Ih
Ireland	3,970	1182	2.98	1:1353	Ii, IIb, [8]
Italy	58,057	5064	0.872	1:4238	IIc, [21]
Latvia	2,306	24	0.104		[7]
Lithuania	3,608	47	0.130		[7]
Luxembourg	463	20	0.431		[7]
Malta	397	23	0.579		IV
Netherlands	16,318	1275	0.781	1:4750	IIa, [22]
Poland	38,580	987	0.256	1:5000	Ij, [1]
Portugal	10,524	285 <sup>a</sup>	0.271 <sup>a</sup>	1:6000	Ik,[7]
Romania	22,356	238	0.106	1:2056	[23]
Slovakia	5,424	340	0.627	1:1800	IIa, [24]
Slovenia	2,011	66	0.328	1:3000	[7,25]
Spain	40,281	2200 <sup>a</sup>	0.546 <sup>a</sup>	1:3750	II, [13,14]
Sweden	8,986	362	0.403	1:5600	IIa, [26]
United Kingdom	60,271	8284	1.37	1:2381	Im, IIa, IId, [9]

Portugal (Maria Celeste Barreto and Margarida Amaral).

# Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde:

- União Europeia 1 em cada 2000 a 3000 recém-nascidos é afetado pela FQ
- Além da Europa, existe também uma elevada incidência na América do Norte e na Austrália.
- Em Portugal a incidência de FQ calculada é de 1/6000 novos casos de recém-nascidos, por ano



# Diagnóstico

- 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 teste laboratorial de referencia para o diagnóstico da FQ é a prova do suor, com base na concentração elevada de iões cloreto no suor.
- O diagnóstico de FQ é essencialmente clínico e os testes de diagnóstico têm como objetivo principal a sua confirmação, ou, em casos mais atípicos, o seu suporte ou exclusão.

# Prova do Suor

- Idealmente, a prova de suor deverá realizar-se só após as 2-3 primeiras semanas de vida, peso superior a 3 Kg, com o doente clinicamente estável, bem hidratado, sem sinais de doença aguda e sem receber tratamento com corticoides.
- Os indivíduos com suspeita de FQ e com prova de suor normal ou intermédia devem efetuar um estudo genético.
- Nos indivíduos com clínica sugestiva de FQ, a identificação de duas mutações confirma o diagnóstico, mas a sua ausência não exclui

# Prova do Suor

A prova de suor, desenvolvida em 1959 por Gibson e Cooke, designada por *quantitative pilocarpine iontophoresis test* continua a ser o teste *gold standard* para a confirmação diagnóstica

É um método quantitativo que mede a concentração de ião cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) no suor.

*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 chloride analysis- Third Edition.” C34-A3, vol 29 nº 27 da NCCLS e Norma 31/2012 atualizada em 10/01/2014 da DGS.*

# Metodologia

1 - Estimulação Pilocarpínica do suor

2 - Recolha da amostra pelo sistema Macroduct

3 – Doseamento dos Cloretos

Triagem por Conductimetria (WESCOR)-  
(expresso em NaCl)

Quantificação dos Cloretos  
por Potenciometria direta (EML 105),



# Metodologia

Condutividade dos electrólitos no suor pelo método *Macroduct Sweat Collection System/Wescor Sweat Check Conductivity Analyzer*. Resultado expresso em NaCl. –Testes rastreio

Na interpretação de uma prova de suor, há que ter em consideração a metodologia utilizada

Segundo a *Cystic Fibrosis Foundation e guidelines* uma medição da condutividade pelo método *Wescor Sweat Check*, com resultado superior ou igual a 50 mmol/l, deverá ser seguido de uma avaliação quantitativa do ião cloreto.



# Casuística de 2009-2013

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

# Casuística de 2009-2013

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.

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

# Casuística de 2009-2013

## 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%)
<b>Total</b>	<b>472</b>	<b>375 (79.4%)</b>	<b>85 (18.0%)</b>	<b>12 (2.5%)</b>

Diminuição  
um maior  
Esta observação é corroborada pelo facto de a proporção de casos positivos ser superior aos observados nos anos anteriores

3, devido a

# Casuística de 2009-2013

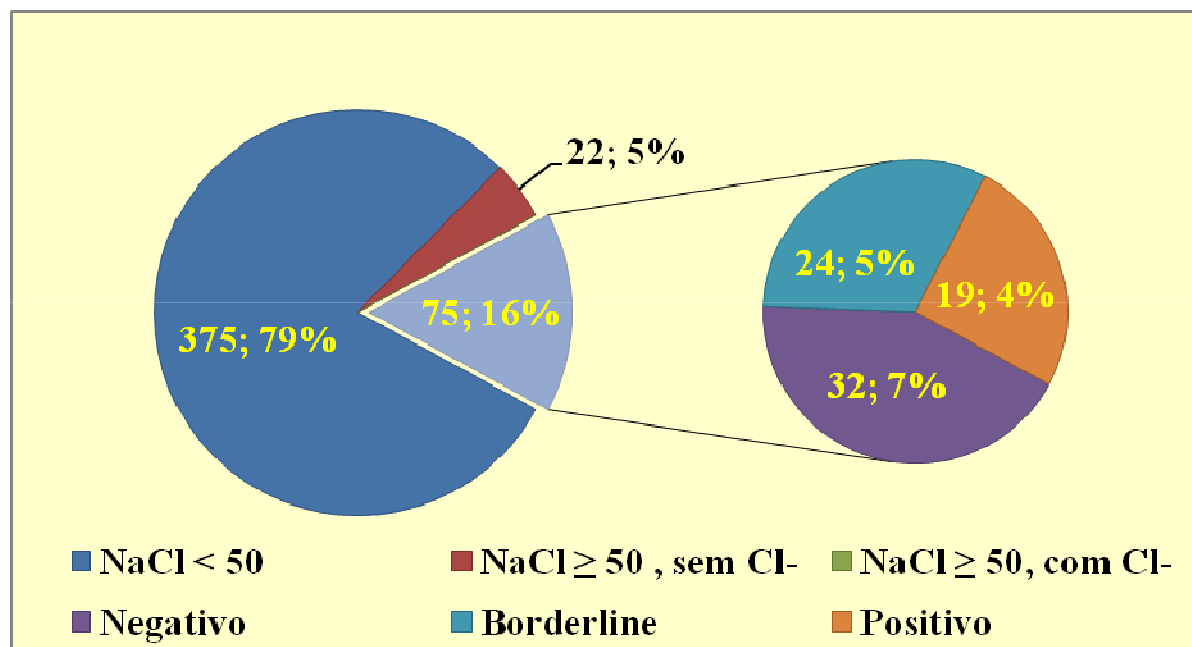
## Resultados da prova do suor por potenciometria direta (Cl<sup>-</sup>)

Resultados por Condutimetria	Nº de amostras	Resultados por Potenciometria Direta (Cl <sup>-</sup> )		
		Negativo Nº (%)	<i>Borderline</i> 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%)
<b>Total</b>	<b>115</b>	<b>72</b>	<b>24</b>	<b>19</b>

A totalidade das amostras com resultado de NaCl <50 mmol/L foi negativa no doseamento de cloretos

# Casuística de 2009-2013

Percentagem de resultados positivos, borderline e negativos para o rastreio e confirmação relativamente ao total de amostras analisadas

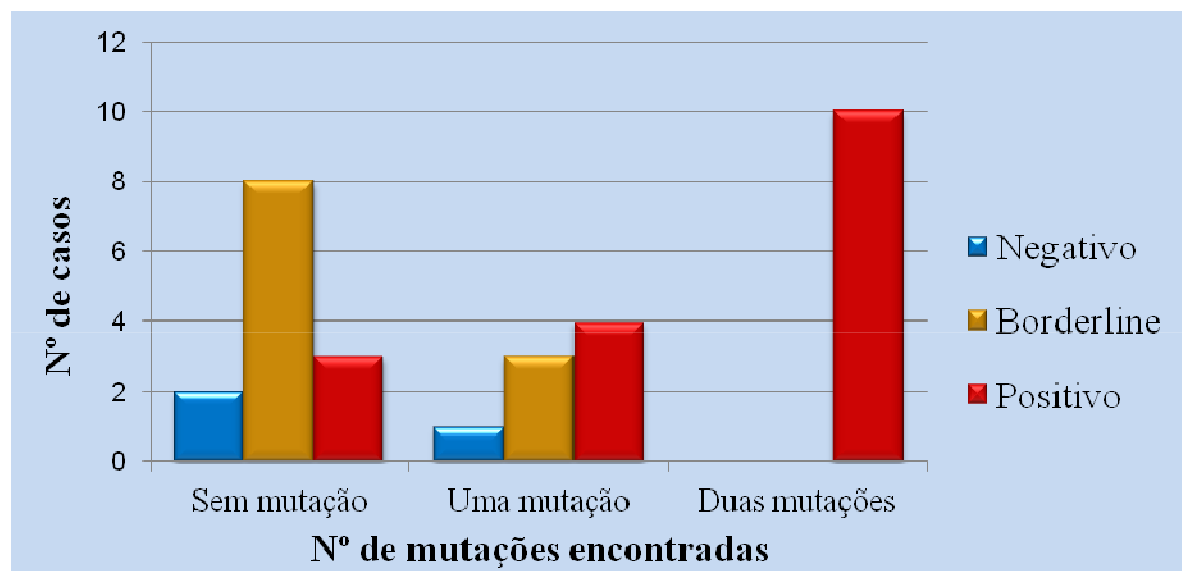


Nos 75 casos em que se doseou o ião cloreto:

19 positivos, 24 borderline e 32 negativos, correspondendo a 4 %, 5 % e 7% do total das amostras estudadas,

# Casuística de 2009-2013

Estudo do Gene *CFTR* efetuado em 31 casos, 15 com resultado de cloretos positivo, 11 borderline e 3 negativos



- 10 (32%) - duas mutações
- 8 (26%) -uma mutação
- 13 (42%), não se encontraram mutações

2 casos com condutimetria borderline ( sem doseamento de Cl-), não foram detetadas mutações.

Criança com 6 meses de idade, com Condutimetria negativa , foi encontrada uma mutação

# CONCLUSÃO

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

Para interpretação de qualquer prova do suor é indispensável que esteja explícito, no resultado laboratorial, o método utilizado na análise do suor

# CONCLUSÃO

Uma prova de suor com resultados dentro dos valores de referência não exclui a doença, pelo que sempre que o quadro clínico seja sugestivo de FQ deve ser pedida nova prova de suor para laboratório que garanta a realização da prova quantitativa.

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 referencia para o diagnóstico da FQ.

# Bibliografia

Accurso FJ. “Update in cystic fibrosis”( 2006). *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 754-7.

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

Philip M. Farrel “ The prevalence of cystic in the European Union”, *Journal of Cystic fibrosis* 7 (2008) 450-453