

Fibrose cística: screening neonatal e diagnóstico

Apresentado por : Bruna Deicke e Maria Paula Nogueira - residentes do terceiro ano do programa de residência médica de pediatria do hospital infantil Joao Paulo II



Sumário

1

Screening neonatal

2

Teste do suor

3

Testes genéticos

4

Conclusão

5

Referências Bibliográficas

Screening Neonatal



SCREENING NEONATAL

IMPORTÂNCIA

Detecção precoce

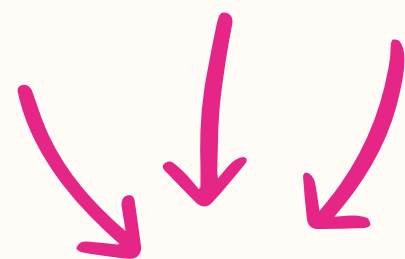
- Intervenção rápida e melhores resultados → pacientes encaminhados para centros de referência e tratados antes mesmo de apresentarem sintomas.
- Crianças com fibrose cística detectados por rastreamento neonatal apresentam melhor função pulmonar e melhores parâmetros nutricionais → menor morbi-mortalidade e maior qualidade de vida.



SCREENING NEONATAL

TESTE DO PEZINHO

- Coleta: Unidades Básicas de Saúde e maternidades → entre o 3º e o 5º dia de vida do RN
- 7 doenças: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doença falciforme e outras hemoglobinopatias, **fibrose cística**, hiperplasia adrenal congênita, deficiência de biotinidase e toxoplasmose congênita



Quantificação dos níveis de **tripsinogênio imunorreativo (IRT)**

Pacientes com fibrose cística: liberação das enzimas pancreáticas é prejudicada e a IRT não é prontamente removida da corrente sanguínea para sua conversão à forma ativa = taxas elevadas de IRT no sangue



SCREENING NEONATAL

TESTE DO PEZINHO

- Primeira dosagem IRT alterada → segunda dosagem **em até 30 dias de vida.**
- Teste inicial: sensibilidade 80%
- Elevadas taxas de falso-positivo ou falso-negativo



2 amostras positivas = realização do teste do suor



SCREENING NEONATAL



Deve-se considerar a fibrose cística em indivíduos com sintomas sugestivos, mesmo quando os resultados da triagem neonatal forem negativos ou inconclusivos.



É importante acompanhar de perto essas crianças durante o primeiro ano de vida, com atenção especial ao **ganho de peso** e às **infecções respiratórias recorrentes**.



TESTE DO SUOR



TESTE DO SUOR

Exame padrão ouro

- Gratuito até o 2º ano de vida
- Pode ser quantitativo (confirmatório) ou qualitativo (triagem)
- Realizado através da coleta de suor com iontoforese de pilocarpina e pela determinação química da concentração de cloreto



TESTE DO SUOR

- **Indicações:**


- RN com resultados positivos na triagem neonatal (IGCo > 36sem, 10-14 dias de vida e >2 kg se assintomáticos)
- Bebês com sintomas sugestivos de fibrose cística (ex: íleo meconial)
- Crianças/ adultos com sintomas sugestivos de fibrose cística (ex: infertilidade masculina, infecções respiratórias crônicas)
- Irmãos de um paciente com fibrose cística confirmada, se o diagnóstico não puder ser estabelecido com base em testes genéticos



TESTE DO SUOR

- **Etapas:**

1. Estimulação da sudorese pela iontoforese por pilocarpina
2. Coleta do suor em gaze, papel-filtro, espirais de plástico, adesivo ou tubo capilar
3. Análise qualitativa ou quantitativa da concentração de cloro e/ou sódio, da condutividade ou da osmolaridade do suor



Recomenda-se que laboratórios qualificados para a realização do teste do suor tenham controle de qualidade interno e externo e que realizem no mínimo 100 testes/ano



TESTE DO SUOR

- Métodos para a dosagem de cloreto:

Método	Descrição	Observações
Titulometria ou colorimetria	Determina a concentração de cloro medindo a absorção de um comprimento de onda de luz específico. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração. O método habitualmente usado é a titulação manual pelo método de Schales & Schales utilizando nitrato de mercúrio.	Depende da experiência do técnico na realização do procedimento. Passível de subjetividade na análise.
Coulometria	Técnica química analítica que utiliza uma reação de eletrólise para medir as mudanças na resistência à corrente entre eletrodos. A concentração do cloreto é equivalente à corrente gerada.	Necessita do equipamento cloridrômetro.
Eletrodo de íon seletivo	Converte a atividade de um íon específico dissolvido em uma solução em um potencial elétrico que é medido por um voltímetro.	Baixa sensibilidade. É um analisador automático que deve ser validado contra os métodos clássicos.



TESTE DO SUOR

- **Teste de condutividade do suor:**

- Seus valores são aproximadamente 15 mmol/L acima da concentração de cloro → mensuração de outros ânions (lactato e bicarbonato)
- As duas técnicas de realização de teste do suor já foram comparadas na literatura → boa concordância do teste da condutividade com a dosagem quantitativa de cloro, tanto para confirmar quanto para afastar o diagnóstico de FC
- Ainda é porém considerado como um teste de triagem e recomendado que pacientes com a condutividade igual ou acima de 50 mmol/L realizem um teste quantitativo.



TESTE DO SUOR

- **Fatores que podem afetar o teste:**

- Quantidade da amostra, evaporação do suor, contaminação, erros na diluição e na calibragem do aparelho
- Outras doenças podem causar elevação da concentração de cloro no suor: dermatite atópica, hipogamaglobulinemia, glicogenose tipo I, mucopolissacaridose tipo I, diabetes insipidus nefrogênico, doença celíaca, insuficiência adrenal, pseudo-hipoaldosteronismo e hipotireoidismo → diferenciação baseado no quadro clínico
- Resultados falso-positivos: síndrome de Down, HIV, desnutrição, desidratação, lesões na pele
- Resultados falso-negativos: presença de edema e uso de mineralocorticoides



TESTE DO SUOR

Valores de referência do teste do suor

	Cloreto, mmol/l	Condutividade, mmol/l
Normal	< 30	< 60
Intermediário	30-59	60-90
Positivo ^a	≥ 60	> 90

^aDeve ser repetido com dosagem quantitativa de cloretos no suor para confirmação em um dia diferente.



TESTE DO SUOR

- **Interpretação:**

- Cloro ≤ 29 mmol/L: suficiente para descartar a fibrose cística na maioria dos indivíduos. Em pacientes com sintomas que sugerem fortemente FC ou história familiar, pode ser necessário repetir o teste do suor e/ou realizar teste de DNA
- Cloro 30 - 59 mmol/L: possível FC → exige avaliação mais aprofundada: repetição do teste do suor e sequenciamento do CFTR
- Cloro ≥ 60 mmol/L: em duas ocasiões, confirma o diagnóstico de FC em pacientes com sintomas clínicos. Para lactentes identificados por triagem neonatal, sintomas clínicos não são necessários para confirmar o diagnóstico.



Aproximadamente 98% dos pacientes com FC apresenta a concentração de cloro no suor acima de 60 mmol/L



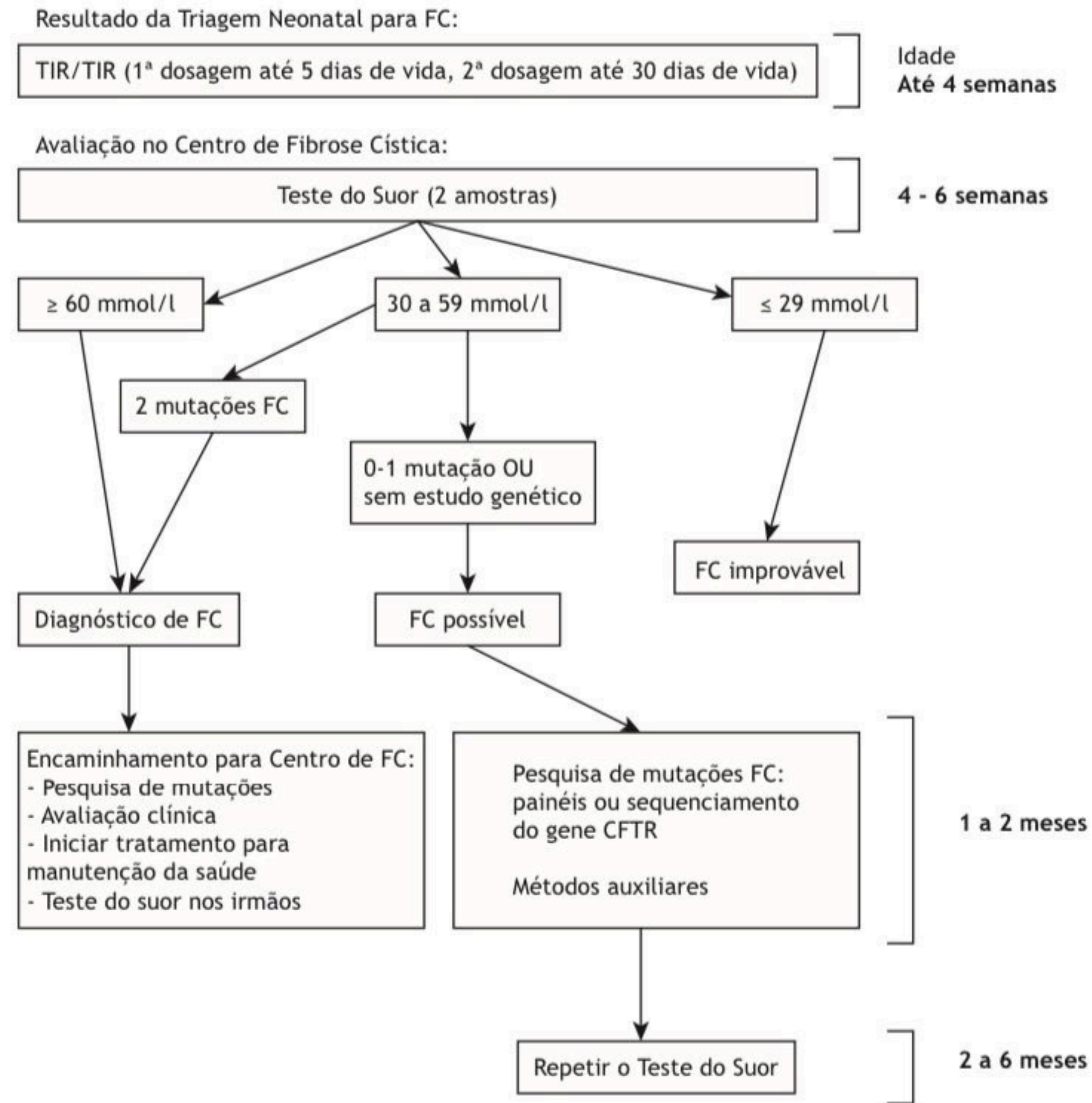


Figura 1. Condução dos casos com triagem neonatal positiva para fibrose cística. FC: fibrose cística; e TIR: tripsinogênio imunorreativo. Adaptado de Farrel et al.⁽²¹⁾

TESTES GENÉTICOS



ANÁLISE DE DNA PARA MUTAÇÕES NO GENE CFTR

- Pode ser usado como teste inicial ou triagem secundária em pacientes com testes iniciais de IRT anormais
- Painéis para detectar as mutações mais comuns no CFTR na população local
- Quando combinado com a análise de IRT, aumenta a sensibilidade para até 96%
- Lactentes com uma ou mais mutações são encaminhados para o teste do suor
- Custo mais elevado, não utilizado no Brasil como teste de triagem



Quais são os critérios mínimos para um laboratório realizar o estudo de mutações do gene CFTR?

- Certificação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- Capacidade para realizar a extração do DNA por diferentes métodos e de diferentes amostras
- Aptidão para identificar a mutação F508del e outras com maior prevalência
- Disponibilidade de realizar a análise de painéis de mutações e/ou sequenciamento completo do gene CFTR, seja em sua unidade, seja com encaminhamento para outros laboratórios
- Capacidade de interpretar e reportar variantes patogênicas



IMPORTÂNCIA DOS TESTES DE DNA PARA MUTAÇÕES NO GENE CFTR

- Identificação das mutações no gene CFTR tem implicações prognósticas e de planejamento familiar, permitindo o diagnóstico da fibrose cística.
- Existem drogas que atuam em mutações específicas (corretores e potencializadores da proteína CFTR), sendo algumas aprovadas em diversos países e outras em desenvolvimento.



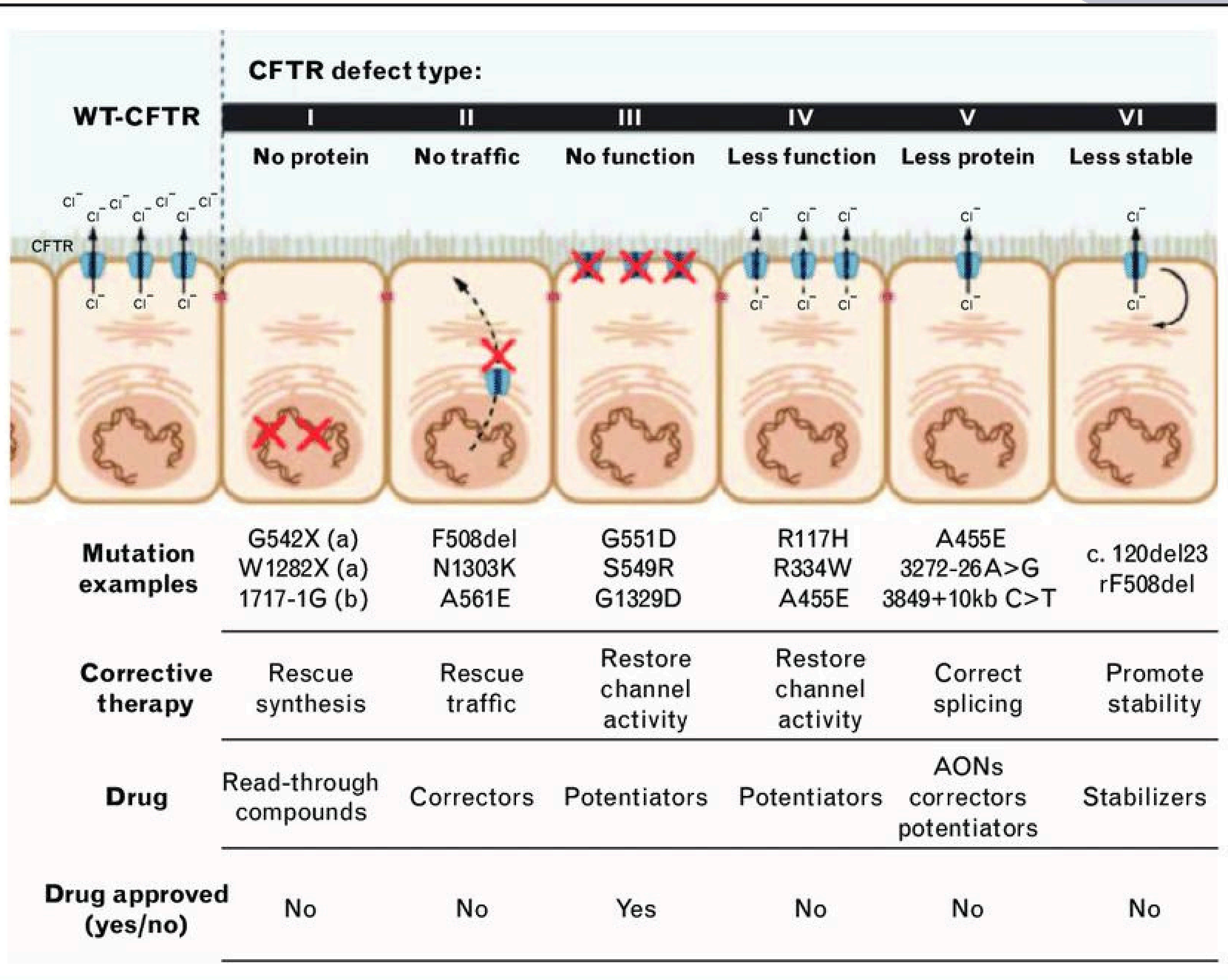
Quadro 2. Benefícios do estudo de mutações no gene *CFTR*.

Benefícios do estudo de mutações no gene *CFTR*

1. Pacientes com diagnóstico estabelecido de FC:
 - para indicação de terapia mutação-específica
 - para determinação de prognóstico (correlação genótipo-fenótipo)
2. Investigação de formas atípicas de FC^a
3. Aconselhamento genético:
 - Indivíduos assintomáticos e sem histórico familiar de FC, quando o cônjuge tem FC ou é portador assintomático de mutação no gene *CFTR* (heterozigoto)
 - Indivíduos assintomáticos quando são parentes de primeiro, segundo ou terceiro grau de caso de FC na família
4. Diagnóstico pré-natal/pré-implantação de FC:
 - Em futura gestação ou na gestação atual, em casais que já tem um filho com FC
 - Em casais heterozigotos se o teste não pode ser feito em um filho com FC
 - Em embriões de casais heterozigotos
 - Quando o feto apresentar intestino hiperecogênico, dilatação de alças intestinais, retardo de crescimento ou supercrescimento sugestivo de dissomia uniparental

FC: fibrose cística. ^aFormas atípicas de FC: sintomas compatíveis e níveis intermediários de cloreto no suor.





Quadro 3. Análise molecular escalonada para a identificação de mutações no gene *CFTR*.

Mutações	Técnica	Motivo
F508del	PCR convencional ou em tempo real	Maior prevalência
Pesquisa de duas mutações já identificadas na família	PCR sítio dirigida, RFLP, hibridização por <i>reverse dot-blot</i> , ARMS, mini sequenciamento ou técnica similar	Presença na família do caso-índice
Identificação individual de mutações de maior prevalência por painéis direcionados	Sondas de hibridização para PCR em tempo real, <i>arrays</i> e kits de mutações comerciais	Elevada prevalência, necessidade de infraestrutura pequena
Mutações não identificadas nos testes anteriores	Sequenciamento bidirecional do gene <i>CFTR</i> pelo método analítico de Sanger ou sequenciamento de próxima geração, de todos os éxons e regiões flangeadoras de éxons/íntrons do gene <i>CFTR</i> , incluindo as variantes poliT no íntron 8	Identificação de mutações no gene <i>CFTR</i> com menor prevalência
Mutações não identificadas nos testes anteriores	Análise de grandes rearranjos no gene <i>CFTR</i> , incluindo deleções, inserções e duplicações, por técnicas semiquantitativas, como PCR em tempo real, MLPA ou técnicas fluorescentes quantitativas (PCR multiplex fluorescente)	Identificação de mutações no gene <i>CFTR</i> com menor prevalência

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase); RFLP: *restriction fragment length polymorphism*; ARMS: *amplification refractory mutation system*; e MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*.



Quando indicar outros testes para a avaliação da função da CFTR?

- Testes da função da CFTR são indicados quando o teste do suor e a análise genética são inconclusivos.
- Esses testes avaliam a função da proteína CFTR através da medida do transporte do cloreto.
- Atualmente, os testes da diferença de potencial nasal e da medida da corrente intestinal são internacionalmente padronizados. Outros testes promissores, como a avaliação da CFTR por evaporimetria e pela diferença de potencial das glândulas sudoríparas, estão sendo estudados.



CONCLUSÃO



O diagnóstico de fibrose cística (CF) é baseado em achados clínicos compatíveis com confirmação bioquímica ou genética. O teste de cloreto de suor é o principal método de confirmação laboratorial, embora testes para mutações específicas, diferença de potencial nasal (NPD), tripsinogênio imunorreativo (IRT), gordura fecal nas fezes ou secreção de enzimas pancreáticas também possam ser úteis em alguns casos.



- Sintomas clínicos consistentes com FC em pelo menos um sistema orgânico, ou triagem neonatal positiva ou ter um irmão com FC



Evidência de disfunção do regulador de condutância da membrana transmembrana da FC (CFTR) (qualquer um dos seguintes):

- Cloreto de suor elevado ≥ 60 mmol/L
- Presença de duas mutações causadoras da doença no gene CFTR, uma de cada alelo parental
- NPD anormal

Referências bibliográficas

- Teste do suor para diagnóstico de fibrose cística. Leone, C. et al. *Recomendações - Atualizações de Condutas em Pediatria*. Volume 73. 2015
- Diretrizes Brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. Athanazio, R. et al. *Jornal Brasileiro de pneumologia*. Volume 43, pp. 219-245. 2017
- Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. Farrel, P. et al. *The Journal of Pediatrics*. V. 181. 2017.
- Update on newborn screening for cystic fibrosis. Wagener J., et al. *The Journal of Pediatrics*. V. 143. 2003.



Obrigada!