

## Pruebas diagnósticas en la fibrosis quística

C. Vázquez Cordero

Unidad de Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística. Hospital de Cruces, Barakaldo (Vizcaya).

(*An Esp Pediatr* 2001; 54 [Supl 2]: 14-17)

Es difícil exagerar acerca de la importancia de que los pacientes con fibrosis quística (FQ), sean diagnosticados con prontitud. Aunque la enfermedad carece todavía de "cura", las terapias disponibles han conseguido mejorar enormemente las expectativas de los afectados que en su gran mayoría alcanzan hoy la edad adulta disfrutando de una buena calidad de vida durante muchos años, lo que era impensable hace solamente dos o tres décadas. El diagnóstico precoz posibilita la instauración de un tratamiento multidisciplinario que disminuye la morbilidad de los pacientes, alivia la ansiedad generada en las familias por la presencia de síntomas carentes hasta entonces de explicación, y finalmente ofrece la posibilidad de un diagnóstico prenatal exacto en eventuales nuevos embarazos, así como la detección de otros portadores en familiares directos y en sus parejas, detectándose eventualmente mediante estos estudios "en cascada" nuevas parejas de alto riesgo<sup>1-4</sup> para tener un hijo con FQ.

La clonación del gen *FQ* (gen *CFTR*) en 1989 y la identificación de más de 900 mutaciones, diferentes causantes de FQ, fue un factor trascendental que ha ayudado a entender el espectro ampliado de la FQ con sus formas leves-atípicas o monosintomáticas, pero no ha resuelto todos los dilemas diagnósticos, y a veces ha planteado nuevos interrogantes sobre las consecuencias clínicas y funcionales de muchas de tales mutaciones, siendo importante su diferenciación de los meros polimorfismos, en sí no causantes de enfermedad. Incluso la secuenciación completa de la región codificante del gen y sus regiones intrónicas limítrofes, no permite la detección de la mutación responsable en una fracción de los cromosomas FQ (aproximadamente 5% en nuestra población). La necesidad de reformular los criterios diagnósticos clásicos de la FQ, fue reconocido por la celebración de una Conferencia de Consenso de la Cystic Fibrosis Foundation (CFF) de EE.UU. en 1997. Varios hechos la pudieron hacer oportuna.

En primer lugar continuaban ocurriendo errores diagnósticos atribuibles a los resultados del test del sudor (única prueba de laboratorio tenida en cuenta en los cri-

terios diagnósticos "clásicos"). Estos errores, en la gran mayoría de los casos eran atribuibles a una técnica deficiente en la realización del test del sudor, o a una mala interpretación de sus resultados, pero incluso con una realización correcta de la prueba se podían obtener el 1 a 2% de resultados con concentración de cloro en el sudor *borderline* (40-60 mmol/l) en pacientes con FQ y raramente (0,1% ?) incluso negativos (< 40 mmol/l). En segundo lugar la puesta en marcha de métodos de *screening* neonatal masivo en distintos lugares de Europa, EE.UU. y Australia, mediante la constatación de una concentración elevada de tripsina inmunorreactiva (TIR) sérica, seguida por la detección de 2 mutaciones causantes de FQ y/o un test del sudor patológico, estaba posibilitando el diagnóstico precoz de algunos pacientes que al menos en un principio estaban absolutamente asintomáticos. En tercer lugar se habían desarrollado técnicas que podían evaluar las anomalías del transporte iónico causadas por la enfermedad directamente a nivel del epitelio respiratorio. Finalmente el hallazgo de una alta prevalencia de mutaciones del gen *CFTR* en patologías diferentes a la FQ clásica como las bronquiectasias diseminadas de origen desconocido, la pancreatitis crónica idiopática, la ausencia bilateral de conductos deferentes, y la aspergillosis broncopulmonar alérgica, planteaba nuevos interrogantes sobre los límites de la FQ.

Las conclusiones de la Conferencia de Consenso de la CFF sobre el diagnóstico de la FQ fueron que puede establecerse el diagnóstico en presencia de uno o más de los tres siguientes: rasgos fenotípicos característicos de FQ, historia de la enfermedad en hermanos o primos hermanos, o tripsina inmunorreactiva elevada en un test de *screening* neonatal, junto con lo que denominan "evidencia de disfunción del CFTR" mediante uno o mas de los tres siguientes: concentración de cloro en sudor > 60 mmol/l, presencia de 2 mutaciones "causantes de enfermedad", o anomalías características en la diferencia de potencial transepitelial (PO) nasal. Los rasgos fenotípicos característicos son: enfermedad sinopulmonar crónica sugestiva, altera-

ciones gastrointestinales y/o nutricionales características, alteraciones del tracto urogenital masculino, o síndromes debidos a pérdidas excesivas de sal por el sudor.

La Conferencia de Consenso de la CFF supuso 4 novedades fundamentales respecto a la situación anterior. En primer lugar el reconocimiento de la fiabilidad de un test de *screening* neonatal para efectuar el diagnóstico en un lactante incluso asintomático. También el reconocimiento de que la presencia incluso de forma aislada de ausencia bilateral de deferentes o (CBAVD) o de síndromes debidos a la pérdida excesiva de electrolitos por el sudor, son suficientes como "rasgos fenotípicos característicos de FQ". En tercer lugar la validez del hallazgo de 2 mutaciones "causantes de enfermedad" incluso con test del sudor normal para establecer la presencia de "disfunción del CFTR". Finalmente la validez en el mismo sentido de la constatación de anomalías del PO nasal incluso con test del sudor normal y genotipo no concluyente.

El Consenso ha supuesto un gran avance, pero algunos investigadores han expresado su inquietud o desacuerdo respecto a algunos puntos. Por ejemplo la pertinencia de diagnosticar FQ a un paciente cuyo único fenotipo constatable en el momento del diagnóstico es una CBAVD o una alcalosis hipoclorémica desarrollada en tiempo caluroso. No hay pruebas de que la gran mayoría de los pacientes con CBAVD aislada desarrollen con el tiempo otros rasgos de FQ, y lo mismo ocurre en algunos con síntomas debidos a pérdidas excesivas de sal por el sudor como única manifestación al diagnóstico. Un seguimiento de tales pacientes es sin embargo esencial para detectar eventualmente el desarrollo de otros rasgos fenotípicos de FQ.

La misma prudencia debe aplicarse a un lactante asintomático diagnosticado por *screening* sin evidencia de insuficiencia pancreática ni de enfermedad respiratoria, y en el que se han detectado una o dos "mutaciones causantes de enfermedad" raras de las que la información que se dispone sobre su impacto clínico es limitado. De tal forma que se ha propuesto por algunos que la fibrosis quística debe seguir siendo primordialmente un diagnóstico clínico y que no es una enfermedad de "todo o nada" sino que abarca un espectro amplio desde la presentación clásica, hasta la fibrosis quística subclínica en la que la investigación cuidadosa es capaz de detectar evidencia clara de la enfermedad en pacientes asintomáticos o mínimamente sintomáticos (ejemplo concentración disminuida de elastasa fecal en pacientes sin clínica de insuficiencia pancreática y con cuantificación de grasa fecal normal, o la constatación de pansinusitis radiológica o bronquiectasias en lóbulos superiores detectables mediante TC en pacientes asintomáticos). En casos con afectación subclínica pero definida, el diagnóstico de FQ parece lógico, pero para casos sin ninguna manifestación evidente, salvo alteraciones en el genotipo, test del sudor o PD nasal se ha propuesto el concepto de "prefibrosis quística" genética, bioquímica o

eléctrica, que pueden o no evolucionar a una FQ subclínica o clínica clásica.

A la mayoría de los pacientes se les confirma el diagnóstico, incluso hoy en día antes de que se dispongan de los resultados del estudio genético. El test del sudor realizado con una correcta metodología y una adecuada interpretación de sus resultados sigue siendo una prueba extremadamente fiable en la discriminación entre población FQ y control. Consta de tres etapas: estimulación de la sudoración, recogida del sudor y análisis de la muestra. El único test aceptable para la confirmación del diagnóstico, es el test cuantitativo de iontoforesis de pilocarpina (QPIT) en el cual la sudoración se estimula en el antebrazo mediante iontoforesis de pilocarpina. El sudor se recoge a lo largo de 30 minutos en un papel de filtro gasa prepesadas (método de Gibson y Cooke), o en un tubo espiral de plástico (método Macroduct). Finalmente se determinan bioquímicamente sin diluir la muestra, en aparato apropiado para el análisis de micromuestras, las concentraciones de cloro y sodio (clorómetro y fotómetro de llama). Otros métodos sólo son aceptables como *screening*, y nunca para la confirmación del diagnóstico. El tamaño mínimo aceptable de la muestra de sudor a analizar es de 100 mg (método de Gibson y Cooke) o de 15  $\mu$ l (Macroduct). No es aceptable el combinar muestras obtenidas de ambos antebrazos para obtener un volumen suficiente, ni el prolongar el tiempo de recogida más de 30 min, ya que se ha señalado que en este caso el sudor procede de glándulas estimuladas submáximamente con el riesgo consiguiente de falsos negativos. El análisis *in situ* de la conductividad eléctrica de la muestra, en la célula incorporada al aparato con el que se estimula la sudoración con el método Macroduct (Sweat check), sólo es aceptable como *screening*. La conductividad eléctrica del sudor se correlaciona con la concentración real de cloro, pero tiene respecto a ella un sesgo positivo bastante variable (el sesgo medio en nuestra experiencia ha sido de 22 mmol/l en pacientes con FQ, y 26 mmol/l en controles). La CFF recomienda realizar una determinación bioquímica de la concentración de cloro si la conductividad valorada mediante Sweat Check es superior a 50 mmol/l.

Dos tests concordantes consecutivos son necesarios para la realización del diagnóstico. Una concentración de cloro > 60 mmol/l es consistente con el diagnóstico de FQ. Valores de 40-60 mmol/l son considerados *borderline* y requieren una investigación exhaustiva incluyendo un estudio genético para confirmar o excluir la FQ. En lactantes concentraciones de cloro de > 40 mmol/l son positivos; la gran mayoría de estos pacientes tienen FQ. Se ha señalado que es posible que algunos adultos no FQ tengan concentraciones de cloro en el sudor entre 60 y 70 mmol/l, siendo la última cifra supuestamente un límite más adecuado en este grupo de edad. Sin embargo por lo general se piensa que el límite de 60 mmol/l es también adecuado

en adultos. Nosotros no hemos encontrado nunca por el momento concentraciones de cloro de más de 60 mmol/l en adultos control. Sin embargo concentraciones entre 40 y 60 mmol/l en este grupo de edad no son raras.

La concentración de cloro en el sudor separa mucho mejor que la de sodio a pacientes con FQ de controles sanos. Con la edad se da en los controles una progresiva elevación de las concentraciones de sodio, de tal forma que en adultos sanos concentraciones de sodio entre 60 y 80 mmol/l no son raras. En nuestra experiencia casi todos los controles tienen concentraciones de sodio en el sudor superiores a las de cloro, mientras que en al menos en 2 de cada 3 casos de FQ ocurre lo contrario. Por lo tanto en casos dudosos con concentraciones borderline de cloro en el sudor, si estas exceden a las de sodio, se considera el hecho como sugestivo de la existencia de FQ.

Otras formas de analizar la muestra como el estudio de sus formas de cristalización, la determinación de la osmolaridad, o la medición "directa" de la concentración de cloro mediante la aplicación de un electrodo cutáneo, no son aceptadas para la confirmación del diagnóstico.

En lo que respecta al genotipaje, el listado actualizado de las mutaciones causantes de enfermedad puede obtenerse a través de la dirección en Internet del Consorcio para el Análisis Genético de la FQ (<http://www.genet.sick-kids.on.ca/cftr/>). Hay que tener en cuenta que no para todas estas mutaciones hay una información sólida respecto a sus consecuencias clínicas y funcionales. Si bien para las más comunes tal información existe, y para otras el tipo de mutación (nonsense, frameshift o de la unión del splice) permite inferir una ausencia o grave déficit funcional de la proteína mutante, para otras como muchas missense que afectan a un número muy pequeño o incluso único de familias, no se dispone de información sobre sus consecuencias funcionales, y para que haya sido aceptada como "causante de enfermedad" ha sido necesario encontrarla en al menos un paciente con diagnóstico clínico de FQ y no encontrarla en al menos 100 cromosomas sanos procedentes de individuos de su mismo grupo étnico. La ausencia de al menos una mutación constatable tras un análisis completo de la región codificante y regiones intrónicas limítrofes, es rara, y debe hacer replantearse el diagnóstico. En nuestra experiencia sobre cerca de 150 pacientes con FQ genotipados ha ocurrido solamente en un caso (datos no publicados). Este caso debe considerarse atípico ya que se trata de una niña de 4 años en la actualidad que fue diagnosticada el primer año de vida por dos episodios de deshidratación con hipocloremia e hiponatremia durante el verano. Dos tests del sudor QPIT fueron consistentes con FQ (concentraciones de cloro entre 60 y 70 mmol/l). Sin embargo la paciente no ha desarrollado por el momento otros rasgos fenotípicos de FQ y nuevos tests del sudor han revelado concentraciones de cloro en sudor *borderline*, entre 40 y 60 mmol/l.

En los últimos años se han descrito polimorfismos, en sí no causantes de enfermedad, pero que pueden modular la actividad del CFTR salvaje, y cuyas combinaciones pueden dar como resultado desde un fenotipo normal hasta una FQ con suficiencia pancreática pasando por una CBAVD. Los más conocidos son el alelo ST en del intrón 8, pero también el alelo polivariante TG en el mismo intrón cuya variante TG 12 se asocia a una producción disminuida de CFTR, así como el polimorfismo M470V en el que la sustitución de la metionina 470 por una valina se asocia a una disminución de las propiedades conductoras de cloro del CFTR maduro.

El epitelio respiratorio, es capaz de regular la composición del líquido periepitelial, mediante el transporte de iones como el sodio y el cloro. Este transporte genera un PD transepitelial, que puede ser medido *in vivo*, habiéndose documentado un patrón de anomalías en los pacientes con FQ, que pueden ser útiles en el diagnóstico. El protocolo de valoración del PD nasal comienza por la medición del PD basal que está elevado (es más electronegativo), reflejando una reabsorción aumentada de sodio, en los pacientes con FQ, comparado con controles, con escaso solapamiento en los valores observados entre ambas poblaciones (media  $-46$  mV frente a  $-19$  mV). La perfusión del epitelio nasal con amiloride en los pacientes, produce un descenso mucho mayor del PD, haciéndose indistinguibles los valores con los de la población control. La perfusión con una solución falta de cloro, en presencia de amiloride, y de una solución falta de cloro junto con un agonista del AMPc como el isoproterenol y con amiloride, en los pacientes no producen una corriente medible de cloro, con aumento del PD, a diferencia de lo que ocurre en controles.

Aunque la medición del PD nasal es segura, y no exige un utillaje excesivamente caro, existen limitaciones que hacen difícil su generalización en la práctica clínica habitual. Su realización exige tiempo, y la presencia de dos personas expertas. Variaciones en la situación del electrodo explorador en las fosas nasales modifican grandemente las mediciones. La existencia de pólipos nasales, inflamación, o trauma también altera las propiedades bioeléctricas del epitelio nasal. Por ello, los resultados de la medición del PD nasal se deben analizar con precaución, y solamente utilizando valores de referencia obtenidos en cada laboratorio, que hayan mostrado en un gran número de observaciones, que discriminan adecuadamente entre pacientes y controles. No existe consenso sobre la correlación entre la gravedad de la enfermedad pulmonar y el grado de anomalía en el transporte iónico en el epitelio respiratorio. Según los datos de los Registros Anuales de la CFF, el número de pacientes con test del sudor y genotipo no concluyentes, que son diagnosticados mediante los resultados de la determinación del PD nasal, es muy escaso (como ejemplo solamente 6 pacientes entre más de 20.000 incluidos en el Registro correspondiente a 1997).

**BIBLIOGRAFÍA**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Sweat testing: sample collection and quantitative analysis; approved guideline. NCCLS document C34-A (ISBN 1-56238-260-8). 1994.
2. Estivill X. Complexity in a monogenic disease. *Nature Genet* 1996; 12: 348-350.
3. Stem RC. The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1997; 336: 487-491.
4. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr* 1998; 132: 589-595.
5. Bush A, Wallis C. Time to think again: cystic fibrosis is not an "all or none" disease. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30: 139-144.
6. Noone PG, Pue CA, Zhou Z, Friedman KJ, Wakeling EL, Ganeshanathan M, Simon RH, Silverman LM, Knowles MR. Lung disease associated with the IVS8 5T allele of the CFTR gene. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1919-1924.