

Nova Era no Diagnóstico da Discinesia Ciliar Primária

A New Era in the Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia

Carolina Constant^{1,2}, Rodrigo Sousa^{1,2}, Andreia Pinto³, JF Moura Nunes⁴, Pedro Sampaio⁵, Susana Santos Lopes⁵, Teresa Bandeira^{1,2}, Luísa Pereira¹

Acta Pediatr Port 2018;49:235-42

DOI: 10.21069/APP.2018.14652

Resumo

Introdução: A discinesia ciliar primária é uma doença genética rara que determina alterações estruturais e/ou funcionais dos cílios, cujo diagnóstico, alvo de padronização recente, resulta numa abordagem estruturada com base clínica e laboratorial protocolada. O objetivo deste estudo é descrever o processo de diagnóstico centralizado aplicado a um grupo de crianças elegíveis.

Métodos: Análise descritiva dos casos submetidos ao processo diagnóstico para discinesia ciliar primária efetuado durante os primeiros dois anos de funcionamento, em crianças seguidas num único centro hospitalar. Recolha retrospectiva dos dados.

Resultados: Foram estudados 10 doentes (mediana da idade 9,9 anos; cinco rapazes). Os padrões clínicos mais frequentes foram dificuldade respiratória neonatal em nove, doença respiratória supurativa alta em dez e baixa (tosse produtiva crónica em oito e bronquiectasias em seis). A medição do óxido nítrico nasal foi normal em dois casos e muito reduzida, sugestiva de discinesia ciliar primária, em seis. A avaliação da ultraestrutura ciliar por microscopia eletrónica de transmissão identificou alterações em sete doentes e três foram inconclusivos. A análise do padrão e frequência do batimento ciliar por videomicroscopia de alta velocidade detetou alterações compatíveis em sete doentes e foi inconclusiva em três. Em reunião multidisciplinar, seis casos foram considerados como prováveis / confirmados e quatro inconclusivos. O estudo genético efetuado em sete doentes revelou alterações em seis, confirmando o diagnóstico de discinesia ciliar primária em sete.

Discussão: Estes são os primeiros resultados de uma série de crianças com o diagnóstico de discinesia ciliar primária efetuado através de um processo estruturado, centralizado e interdisciplinar. Os exames inconclusivos ou normais foram avaliados e decididos por interpretação conjunta dos resultados.

Palavras-chave: Criança; Doenças Genéticas Inatas; Doenças Respiratórias; Síndrome de Kartagener/diagnóstico; Transtornos da Motilidade Ciliar/diagnóstico

Abstract

Introduction: Primary ciliary dyskinesia is a rare genetic disorder that results from abnormal motile ciliary structure and/or function, the diagnosis of which, recently standardised, relies on a structured approach based on clinical presentation and complementary tests. The aim of this study is to describe this centralised diagnostic process applied to a group of eligible children.

Methods: A descriptive analysis with retrospective chart review was performed of cases submitted for diagnosis of primary ciliary dyskinesia during the first two years of the process, in children from a single hospital centre.

Results: Ten patients (median age 9.9 years; five boys) were studied. The most frequent clinical patterns were

neonatal respiratory distress in nine, suppurative respiratory disease including chronic/recurrent otitis media in 10, chronic productive cough in eight, and bronchiectasis in six. Nasal nitric oxide levels were normal in two patients and very low, suggestive of primary ciliary dyskinesia, in six. Ultrastructural defects were identified by transmission electron microscopy in seven patients and three results were inconclusive. With high-speed video microscopy analysis, changes were detected in seven patients and three results were inconclusive. At multidisciplinary meetings, six cases were considered as probable/confirmed and four as inconclusive. Genetic testing in seven patients revealed mutations in six, confirming the diagnosis.

Discussion: These are the first results of a series of chil-

1. Unidade de Pneumologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Académico de Medicina de Lisboa, Lisboa, Portugal

2. Laboratório Pediátrico de Estudos da Função Respiratória, Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Académico de Medicina de Lisboa, Lisboa, Portugal

3. Laboratório de Histologia e Patologia Comparada, Instituto de Medicina Molecular, Centro Académico de Medicina de Lisboa, Lisboa, Portugal

4. Serviço de Anatomia Patológica, Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Lisboa, Portugal

5. Centro de Estudos de Doenças Crónicas, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

Correspondência

Carolina Constant

carolinaconstant@sapo.pt

Unidade de Pneumologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Académico de Medicina de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-035 Lisboa, Portugal

Recebido: 04/05/2017 | Aceite: 16/11/2017

dren diagnosed with primary ciliary dyskinesia through a structured, centralised and interdisciplinary process. Normal or inconclusive exams were assessed and decided upon based on the interpretation of all results in conjunction.

Keywords: Child; Ciliary Motility Disorders/diagnosis; Genetic Diseases, Inborn; Kartagener Syndrome/diagnosis; Respiratory Tract Diseases

Introdução

A discinesia ciliar primária (DCP) é uma doença genética rara, determinada por alterações no padrão de batimento e eventualmente na estrutura dos cílios móveis, organelos microscópicos localizados na superfície apical das células epiteliais respiratórias, que comprometem a *clearance* muco-ciliar das vias aéreas.^{1,2} Várias mutações são responsáveis por compromissos na biogénese, estrutura, função ou organização ciliar, resultando em diferentes padrões clínicos e histológicos, o que contribui para a dificuldade diagnóstica.^{1,3,4} A variabilidade da expressão clínica de DCP e a dificuldade no estabelecimento diagnóstico têm contribuído para o subdiagnóstico e potencialmente para evoluções a longo prazo mais graves, com infeção crónica oto-sino-pulmonar e compromisso funcional incluindo insuficiência respiratória. Estima-se uma prevalência de DCP de uma em 10 000 pessoas, o que coloca esta doença no grupo das doenças raras, com desafios para os doentes, profissionais de saúde e investigadores.⁵ Coexistem, com frequências diversas, *situs inversus*, síndromes heterotáxicas e doença cardíaca congénita.⁶ Não existe nenhum teste isolado que seja *gold standard* para o diagnóstico de DCP.^{3,4,7} Recentemente, um grupo de peritos sediados na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) contribuíram para aumentar o nível de alerta para os sintomas e sinais da doença, e também para a sua referência a centros de diagnóstico, monitorização e tratamento especializados.^{1,8} Daqui resultou uma tentativa de padronização do diagnóstico, que assenta numa combinação de investigações, tecnicamente exigentes, que incluem determinação do óxido nítrico nasal (nNO), análises da frequência e padrão de batimento ciliar por videomicroscopia de alta velocidade (VMAV) e da ultraestrutura ciliar por microscopia eletrónica de transmissão (MET).³ O anterior teste da sacarina para o rastreio de DCP já não está recomendado.^{1,3} Testes de diagnóstico mais sofisticados com potencial para melhorar a precisão diagnóstica (estudo genético, avaliação de proteínas ciliares por imunofluorescência e tomografia de microscopia eletrónica) estão crescentemente disponíveis.³

A disponibilidade e combinação dos testes diagnósticos varia entre países e entre centros.^{7,9} Em Portugal, historicamente, o diagnóstico baseava-se unicamente nos achados de defeitos da ultraestrutura ciliar visualizados por MET.¹⁰ Contudo, desde meados de 2014, passou a ser possível também a realização de VMAV e medição do nNO num consórcio que inclui um centro clínico, num hospital central universitário, e centros laboratoriais e de investigação de referência em Lisboa. Neste cenário, os autores criaram um grupo de estudos para o diagnóstico de DCP, cujo protocolo inclui a colheita e registo estruturados da clínica, medição do nNO, colheita de células epiteliais respiratórias por escovado nasal (ou brônquico) e exame ciliar por MET e VMAV, que culmina com discussão multidisciplinar para determinar a probabilidade diagnóstica de DCP, em cada doente, e elaboração de relatório final. O objetivo deste estudo é a descrição do processo de diagnóstico centralizado, interdisciplinar e protocolado, para o estudo da DCP aplicado a um grupo de crianças.

Métodos

Seleção dos doentes

Estudo transversal, retrospectivo, com inclusão de todas as crianças com suspeita diagnóstica de DCP acompanhadas em consulta de pneumologia pediátrica num hospital central, universitário, da área metropolitana de Lisboa, ao longo dos dois primeiros anos de funcionamento do grupo de estudos organizado em consórcio multidisciplinar (entre julho de 2014 e junho de 2016). Foram recolhidos dados demográficos, clínicos e dos testes de diagnóstico.

Os dados clínicos foram também usados para calcular o *score* PICADAR (*primary ciliary dyskinesia rule*).¹¹ O PICADAR é um sistema de predição clínica desenvolvido por um grupo de trabalho europeu, e já validado externamente, dirigido a doentes com tosse produtiva persistente e que inclui sete variáveis preditivas: sintomas respiratórios neonatais em recém-nascido de termo, admissão em unidade de cuidados intensivos neonatais, rinite crónica perene, sintomas persistentes no ouvido médio, *situs inversus* ou heterotaxia e cardiopatia congénita. Apresenta uma sensibilidade e especificidade de 0,90 e 0,75, respetivamente, para uma pontuação de cinco pontos.¹¹

Todas as crianças foram submetidas a escovado nasal (cornetos inferiores) e obtidas duas amostras de células epiteliais respiratórias. Estas foram imersas em meio de cultura apropriado, até processamento e análise posterior. Foi obtido consentimento informado para a realização dos testes de diagnóstico, após explicação de todos os procedimentos.

Testes diagnósticos

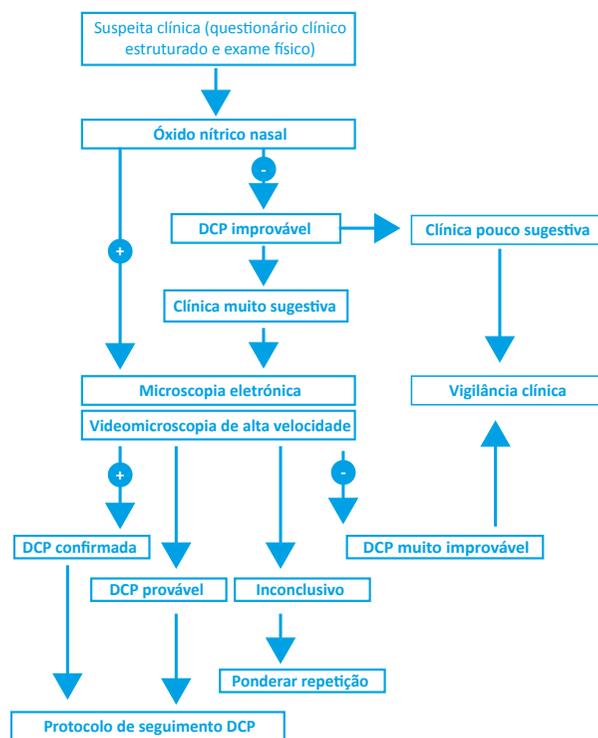
A medição do óxido nítrico nasal foi efetuada com o analisador eletroquímico portátil NIOX MINO® Nasal (Aerocrine AB, Solna, Sweden), em modo nasal (taxa de fluxo 5 mL/s, limites de deteção 5-1700 ppb). O procedimento foi efetuado de acordo com as diretrizes da American Thoracic Society / European Respiratory Society (ATS/ERS)¹² e recomendações do fabricante, após explicação e exemplificação prévias. Após inspeção e lavagem nasal introduziu-se oliva nasal (pediátrica ou de adulto escolhida de acordo com o tamanho da criança) numa das narinas, assegurando alinhamento entre o orifício de amostragem e as fossas nasais. Para a realização do procedimento é selecionada a taxa de fluxo 5 mL/s, aguarda-se que o dispositivo faça a aspiração do gás nasal e o valor do nNO (em ppb) é registado no visor. Foram efetuadas medições em ambas narinas e na narina onde se registou o maior valor foram repetidas as manobras de forma a obter, como resultado final, a média de três medições. As medições foram efetuadas com as crianças a respirar em volume corrente e de boca aberta. Valores inferiores a 142 ppb foram considerados sugestivos de DCP.¹³

Na microscopia eletrónica de transmissão, as amostras obtidas por escovado foram imediatamente fixadas e processadas de acordo com protocolo do laboratório. Foram efetuados cortes com recurso a ultramicrotomo Reichert Supernova (Leica Microsystems). Os cortes semi-finos (500 nm) foram corados com azul de toluidina e as áreas de interesse selecionadas. Os cortes ultrafinos (80 nm) foram contrastados com acetato de uranilo 2% em 70% de metanol e citrato de chumbo, e visualizados num MET Hitachi H-7650 (Hitachi - Science & Technology) a 100 Kv. Todos os cílios em corte transversal foram analisados. O exame ultraestrutural foi realizado por método quantitativo, de acordo com protocolo do laboratório. A videomicroscopia de alta velocidade (VMAV) foi realizada após imersão da escova em meio de cultura apropriado, as amostras foram observadas num microscópio invertido Nikon Eclipse Ti-U (Nikon Instruments) acoplado a uma câmara de vídeo de alta velocidade FASCAM MC2 (Photron). As células ciliadas foram filmadas a uma velocidade de 500 frames por segundo com uma objetiva de imersão em óleo de abertura numérica 1.30 com uma ampliação total de x 1000. Efetuou-se a análise do padrão de batimento ciliar (PBC) e da frequência de batimento ciliar (FBC), em temperatura ambiente (25°C), através dos métodos semiautomático e automático, após as regiões de interesse serem manualmente selecionadas pelo observador, evitando zonas com muco ou com obstáculos ao movimento ciliar. Para ambos os métodos foram

analisados 10 grupos celulares diferentes. Foram calculadas as médias da FBC para cada doente e os resultados apresentados como histogramas. Consideraram-se valores de FBC normais 4,25-11,63 Hz (mediana 6,36 Hz).¹⁴ O estudo genético foi efetuado em parceria com o Serviço de Genética e Medicina Genómica do University College of London, Institute of Child Health (Londres, Reino Unido), de forma pontual e em contexto de investigação usando o painel *multi-gene motile cilome next generation sequencing*. Foram enviadas amostras de sangue dos doentes e suas famílias, que aceitaram e consentiram participar.

Reunião do grupo de estudos para o diagnóstico de DCP

Para todos os doentes foi efetuada reunião multidisciplinar com pelo menos um profissional de cada equipa. De acordo com protocolo interno (Fig. 1), e após avaliação de todos os dados diagnósticos (clínica, nNO, MET e VMAV), os casos são classificados como DCP muito improvável, DCP confirmada, DCP provável ou resultado inconclusivo.³ Os casos inconclusivos podem resultar de situações em que as alterações encontradas não são típicas de DCP, se as alterações forem sugestivas de discinesia ciliar secundária e/ou se a baixa qualidade da amostra impedir conclusões definitivas. Nos casos dependentes da qualidade das amostras é discutida e ponderada a necessidade de repetição das colheitas.



DCP - discinesia ciliar primária.

Figura 1. Fluxograma de decisão diagnóstica de discinesia ciliar primária.

Resultados

Durante estes dois anos, foram estudadas 14 crianças, uma delas submetida a duas colheitas de escovado nasal com oito meses de intervalo. As características demográficas e de apresentação clínica, incluindo idade no diagnóstico e valor de PICADAR, e os resultados da medição do nNO, e análise por MET e VMAV dos 10 doentes em que o estudo foi positivo ou inconclusivo estão descritas na Tabela 1. Em quatro doentes, o diagnóstico de DCP foi considerado muito improvável, uma vez que os testes de diagnóstico não revelaram alterações, pelo que foram retirados da presente análise, permanecendo, contudo, em seguimento em consulta hospitalar.

Sumarizando, nos doentes avaliados de acordo com o protocolo de estudo, com resultados positivos ou inconclusivos, a mediana de idade foi de 9,9 anos (mínimo 3,3 anos e máximo 16,5 anos), metade eram do género masculino.

Testes diagnósticos

- A determinação de nNO foi normal em dois doentes, reduzida acima do valor de *cut-off* para o diagnóstico de DCP em outros dois e muito reduzido sugestivo de DCP em seis doentes.

- Na TEM (Fig. 2) os achados foram, em três doentes, defeitos nos braços externos de dineína, em dois doentes desarranjos tubulares, num doente defeitos nos braços externos e internos de dineína e aplasia ciliar noutro doente, sendo inconclusivo em três.

- Na VMAV (Fig. 3) foram observados cílios estáticos em três doentes, PBC descoordenado e de baixa amplitude, mas com FBC dentro da normalidade em quatro e resultados inconclusivos em três.

- O estudo genético realizado em sete doentes (casos 1 a 5, 7 e 10) revelou a presença de mutações em homozigotia ou heterozigotia composta a nível dos genes *ZMYND10*, *DNAH5*, *CCDC40*, *CCNO* e *RSPH1*. Estes resultados foram apenas conhecidos no decorrer do presente ano.

Reunião do grupo de estudos

Foi diagnosticada DCP em sete doentes (Tabela 1). Para o caso 5 (doente com 6 anos) foi decidida repetição da colheita em reunião multidisciplinar, dado o fenótipo clínico fortemente sugestivo de DCP e os níveis reduzidos de nNO. Apesar das alterações encontradas na MET (aplasia ciliar) não serem as características de DCP, os resultados da repetição foram idênticos e foi decidido classificar o caso como DCP provável, uma vez que já existem casos semelhantes descritos na literatura.^{3,15}

O conhecimento posterior da existência de mutações genéticas (gene *CCNO*) veio confirmar a hipótese do grupo. Para o caso 2 (doente com 10 anos), embora a qualidade da amostra dificultasse conclusões definitivas, os achados encontrados por MET foram semelhantes aos da irmã (caso 3, doente com 16 anos), observando-se defeitos nos braços externos de dineína, pelo que foi decidido em reunião classificar o caso como PCD provável, confirmada posteriormente por testes genéticos que identificaram a presença de mutações no gene *DNAH5*. O caso 7 (doente com 15 anos), foi inicialmente classificado como inconclusivo em reunião do grupo de estudo, uma vez que as alterações encontradas não permitiam excluir DCP. Novamente, a identificação de mutações bi-aliélicas não ambíguas em genes já identificados como causadores de DCP obviou a necessidade de repetição de colheitas. Nos restantes três doentes, foi decidido, em reunião do grupo de estudo, repetir a medição do nNO e a colheita do escovado nasal para nova análise por MET e VMAV, uma vez que as alterações encontradas não permitem excluir DCP, e as mesmas estão agendadas.

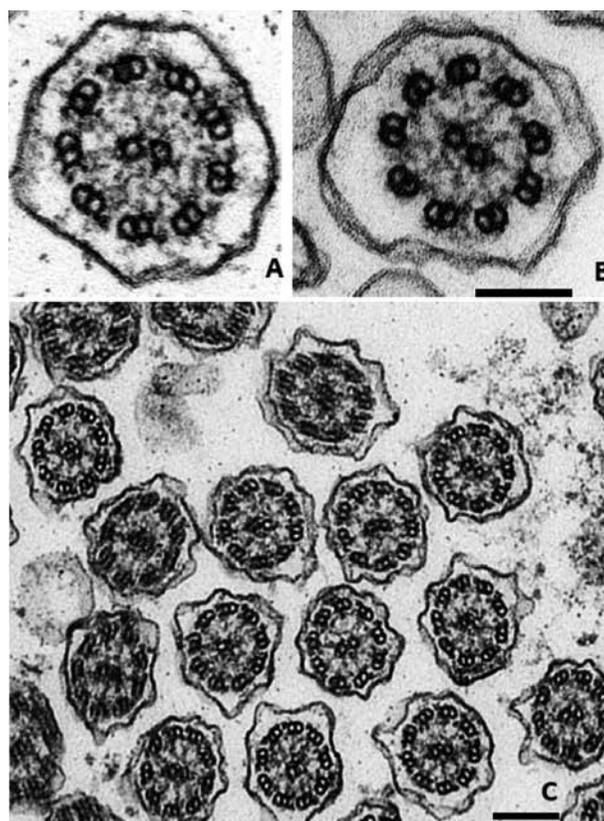


Figura 2. Imagens de detalhes ultraestruturais de cílios em corte transversal. Cílio de ultraestrutura normal 9 + 2 com braços internos e externos de dineína visíveis (A); cílio de ultraestrutura 9 + 2 mas com ausência de braços externos de dineína (B); grupo de cílios de ultraestrutura normal (C) (barra = 100 nm).

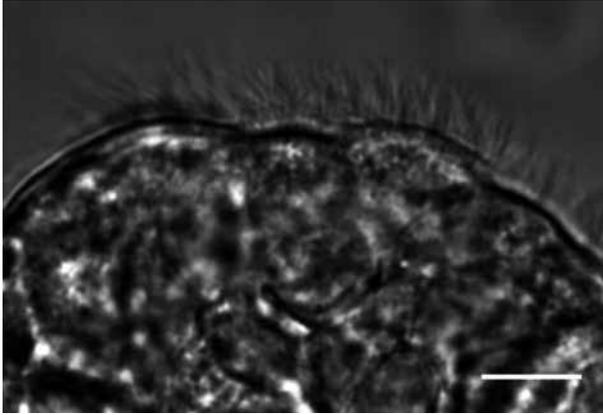


Figura 3. Imagem de videomicroscopia de alta velocidade de agrupamento celular onde é visível bordo ciliado (barra = 100 mm).

Discussão

Nos primeiros dois anos de funcionamento do consórcio multidisciplinar para o diagnóstico de DCP foram estudados 14 doentes provenientes dum único centro. O diagnóstico de DCP foi afastado em quatro casos, confirmado em sete casos e três ainda se encontram no processo de diagnóstico, uma vez que ainda não se pode excluir DCP. A mediana de idades desta série foi de 9,9 anos, a grande maioria apresentava manifestações clínicas muito sugestivas, com doença supurativa respiratória oto-sino-pulmonar, com bronquiectasias em mais de metade dos doentes, o que se traduz nos índices elevados dos *scores* clínicos preditivos de DCP (Tabela 1). *Situs inversus* verificou-se em apenas uma doente e nesse caso específico com suspeição diagnóstica precoce pela concomitância de eventos respiratórios no período neonatal. A criança foi submetida a colheita de escovado nasal para estudo ciliar aos três anos. Em geral, a idade no diagnóstico nesta série foi superior ao descrito na literatura. Segundo um estudo publicado em 2010 sobre a epidemiologia da DCP na Europa, efetuado através da aplicação de questionários a instituições que tratassem crianças com DCP, a mediana de idade para o diagnóstico foi de 5,3 anos (inferior nos doentes com *situs inversus* 3,5 vs 5,8 anos), sendo de 6,5 anos no sul da Europa.⁹ Especificamente, os dados referentes a Portugal, que incluíram seis crianças, revelaram 6,1 anos de mediana de idade no diagnóstico, e *situs inversus* presente em cinco desses doentes.⁹ A presença de defeitos de lateralidade pode explicar a idade mais precoce na suspeição e consequente confirmação diagnóstica desses doentes. Neste estudo, elaborado na fase inicial de consolidação do consórcio, foram selecionados doentes com fenótipos clínicos muito sugestivos a partir duma consulta de pneumologia pediátrica de um hospital central, o que pode justificar o predomínio de doença

respiratória e uma elevada taxa de resultados positivos, comparativamente ao descrito na literatura.¹⁶ Esta seleção de doentes acumulados em consulta de especialidade cria provavelmente um viés de observação que dificulta comparações com outras séries provenientes duma base mais alargada de referência e que o consórcio espera poder vir a estudar.

Apesar do número reduzido de doentes diagnosticados na nossa série, as alterações encontradas nos testes diagnósticos são semelhantes ao descrito na literatura.^{3,16,17} Relativamente à medição do nNO existem descrições de doentes com diagnóstico inequívoco de DCP com níveis de nNO normais, e se o nNO fosse usado isoladamente como rastreio de DCP, cerca de 10% dos casos seriam perdidos.¹⁷ Na MET, as alterações mais frequentemente descritas são os defeitos nos braços externos de dineína e a combinação de defeitos nos braços externos e internos de dineína,^{3,16,18} sendo que resultados indeterminados ou inconclusivos ocorrem também.¹⁸ Especificamente na VMAV, deve ser feita análise conjunta do PBC e FBC, visto que a FBC isoladamente não diferencia adequadamente os casos de DCP dos casos sem DCP. Enquanto que as associações entre genótipo e os defeitos ultraestruturais documentados por MET estão bem estabelecidas, os dados são insuficientes para correlacionar as mutações dentro de um gene e o fenótipo disquinético.³ Assim sendo, para a confirmação genética da DCP, o defeito ultraestrutural e o genótipo devem correlacionar-se. No futuro, correlações entre mutações genéticas e padrões específicos de batimento ciliar poderão também auxiliar no diagnóstico.³ A genotipagem é particularmente útil quando a confirmação diagnóstica é difícil por outros métodos, como por exemplo, para mutações nos genes *RSPH* e *CCNO*. Na nossa série, os resultados do estudo genético foram decisivos para o caso 5 (doente com 6 anos), em que mutações a nível do gene *CCNO* se associam a redução marcada do número de cílios móveis na superfície celular¹⁵; e para o caso 7 (doente com 15 anos) em que mutações a nível dos genes *RSPH* podem apresentar ultraestrutura normal ou discretamente anormal. Especificamente dos casos confirmados, este caso foi o único que teve níveis de nNO normais, o que corresponde à situação já descrita de DCP inequívoca com nNO normal. Numa série está descrita uma doente com DCP provocada por mutações ao nível do gene *RSPH1* e níveis de nNO normais.¹⁹

Importa ainda referir que o diagnóstico de DCP pode ser um processo prolongado e que exige uma série de recursos coordenados. No grupo de doentes apresentado, uma doente foi submetida a repetição de colheita de escovado nasal e nova análise ciliar, e três doentes encontram-se no mesmo processo de repetição do

estudo ciliar pela qualidade das amostras e/ou presença de alterações ciliares secundárias.

O processo diagnóstico da DCP é complexo e combina vários testes, cada um com contributos específicos, mas também com limitações,^{2,8} pelo que a coordenação e discussão de resultados com valorização clínica são indispensáveis.

A literatura refere igualmente, com frequência, amostras inadequadas ou resultados inconclusivos e a necessidade de repetição.^{3,17} O tempo até se obter um resultado conclusivo varia consideravelmente entre os doentes.⁸ A cultura de células respiratórias melhora a precisão diagnóstica, ao eliminar os falsos positivos ou alterações secundárias.³ No nosso grupo, de momento

não existindo a possibilidade de efetuar cultura de células respiratórias para reavaliação, recorreu-se à repetição das colheitas nos casos inconclusivos.

A DCP é uma doença rara, subdiagnosticada e diagnosticada tardiamente, o que pode influenciar a gravidade clínica na evolução e aumentar as dificuldades dos doentes, profissionais de saúde e investigadores.^{2,20} Dada a complexidade dos métodos de diagnóstico, que requerem infraestruturas dispendiosas e equipas de clínicos e cientistas experientes, as recomendações internacionais sugerem que este seja feito em centros de referência.^{2,8,20} Consequentemente, foram publicadas recomendações baseadas em evidência para a utilização de seis testes habitualmente considerados no diagnóstico da

Tabela 1. Caracterização dos casos de discinesia ciliar primária confirmados ou prováveis e resultados inconclusivos

ID	Idade (anos)	Principais características clínicas na apresentação	nNO (ppb)	Microscopia eletrónica de transmissão	Videomicroscopia de alta velocidade	Teste genético
Casos de DCP confirmada / provável						
Caso 1 Rapaz	4,5	Irmão de doente com DCP, SDR neonatal, tosse produtiva crónica, OM recorrente (PICADAR 8)	10,7	Má qualidade da amostra Defeitos nos braços internos e externos de dineína	Cílios estáticos	Homozigotia, gene <i>ZMYND10</i>
Caso 2 Rapariga	10,5	TTRN, OM recorrente, sinusite, tosse produtiva crónica, bronquiectasias (PICADAR 8)	52,7	Má qualidade da amostra Defeitos nos braços externos de dineína - inconclusivo	Má qualidade da amostra PBC pouco coordenado; FBC média 5,94 Hz - inconclusivo	Heterozigotia composta, gene <i>DNAH5</i>
Caso 3 Rapariga	16,5	Irmã de doente com DCP, SDR neonatal, OM recorrente, tosse produtiva crónica (PICADAR 7)	95,0	Defeitos nos braços externos de dineína	PBC maioritariamente descoordenado e de baixa amplitude; FBC média 5,83 Hz	Heterozigotia composta, gene <i>DNAH5</i>
Caso 4 Rapaz	9,3	Ventriculomegalia, pneumonia neonatal, OM recorrente, tosse produtiva crónica, bronquiectasias (PICADAR 10)	8,7	Má qualidade da amostra - inconclusivo	Cílios estáticos	Heterozigotia composta, gene <i>CCDC40</i>
Caso 5 Rapariga	6,3	Ventriculomegalia, SDR neonatal, OM recorrente, tosse produtiva crónica, bronquiectasias (PICADAR 8)	26,9	Aplasia ciliar, cílios encontrados sem alterações ultraestruturais (ambas amostras)	Epitélio desciliado, cílios encontrados com PBC descoordenado; FBC média 9,63 Hz e 6,34 Hz	Homozigotia, gene <i>CCNO</i>
Caso 6 Rapariga	11,5	SDR neonatal, OM recorrente, tosse produtiva crónica, bronquiectasias (PICADAR 8)	12,7	Ausência dos braços externos de dineína	Cílios estáticos	—
Caso 7 Rapaz	15,6	SDR neonatal, OM recorrente, tosse produtiva crónica, bronquiectasias (PICADAR 8)	531,3	Sem alterações sistemáticas da ultraestrutura, mas observados cílios com anomalias no raio (<i>radial spoke</i>) - inconclusivo	PBC descoordenado e de baixa amplitude; FBC média 6,58 Hz	Homozigotia, gene <i>RSPH1</i>
Casos Inconclusivos						
Caso 8 Rapaz	11,3	SDR neonatal, OM recorrente, tosse produtiva crónica, bronquiectasias (PICADAR 8)	351,7	Má qualidade da amostra - inconclusivo	Má qualidade da amostra - inconclusivo	—
Caso 9 Rapariga	3,3	<i>Situs inversus totalis</i> , pneumonia neonatal, OM recorrente (PICADAR 12)	207,3	Má qualidade da amostra - inconclusivo	Amostra sem agrupamentos celulares - inconclusivo	—
Caso 10 Rapaz	3,6	Prematuridade tardia (36 semanas), OM crónica, otorreia persistente (PICADAR 2)	159,3	Má qualidade da amostra Alterações encontradas desarranjos tubulares - inconclusivo	PBC discretamente descoordenado, FBC média 7,13 Hz	Mutações não encontradas

DCP - discinesia ciliar primária; FBC - frequência de batimento ciliar; ID - identificação; nNO - óxido nítrico nasal; OT - otite média PBC - padrão de batimento ciliar; SDR - síndrome de dificuldade respiratória do recém-nascido; TTRN - taquipneia transitória do recém-nascido

A idade é a do momento da colheita do escovado nasal, exceto no caso 5 em que é a idade na segunda colheita do escovado nasal.

Casos 2 e 3 são irmãs.

DCP.³ Esta padronização inclui:

- Os critérios clínicos de suspeição e identificadores dos doentes a estudar;
- A determinação do nNO;
- Análise de VMAV dos cílios;
- MET dos cílios;
- Estudo genético;
- Imunofluorescência de proteínas ciliares.

De acordo com estas recomendações europeias, o diagnóstico de DCP pode ser confirmado num doente com fenótipo clínico sugestivo e defeitos ultraestruturais característicos para a DCP identificados por MET - ausência dos braços externos de dineína, ausência combinada dos braços externos e internos de dineína, ausência dos braços internos de dineína com desarranjos microtubulares -, ou mutações bi-alélicas não ambíguas em genes responsáveis por DCP. O diagnóstico é considerado altamente provável nos doentes com história clínica compatível, níveis muito baixos de nNO e achados consistentes na VMAV sugestivos (por exemplo cílios estáticos ou com movimento circular) em três ocasiões. Os doentes com diagnóstico altamente provável, mas não conclusivo, devem ser informados das limitações dos testes e que o diagnóstico pode necessitar de confirmação assim que estejam disponíveis melhores testes. Outras causas devem ser excluídas e o doente deve ser tratado como se tivesse DCP.³

O consórcio e modelo de interação na marcha diagnóstica apresentado neste estudo aproxima-se das recomendações europeias. Por outro lado, a execução dum relatório conjunto das conclusões do grupo de trabalho relativamente à probabilidade diagnóstica de DCP vai também de encontro às expectativas dos doentes.⁸ Isto é de enorme relevância já que o subdiagnóstico e subreconhecimento da doença contribuem de forma significativa para o atraso no seu diagnóstico com consequências no curto, médio e longo prazo no compromisso do bem-estar e na gravidade da doença.^{6,8} Adicionalmente,

segue também em convergência com as recomendações internacionais, a formação e crescente interação das equipas clínica (PICADAR e nNO) e técnica (MET e VMAV) com centros especializados e reconhecidos no Reino Unido. Esta comunicação é uma das exigências crescentes em diversas doenças raras, sugerindo-se a concentração em centros preferencialmente com experiência no seguimento de outras doenças raras e com potencial de registo nacional e internacional destes doentes.^{5,21}

O QUE ESTE ESTUDO TRAZ DE NOVO

- Exemplifica um processo de diagnóstico de discinesia ciliar primária (DCP) centralizado, de acordo com as últimas recomendações europeias.
- Alerta para os desafios e dificuldade diagnóstica que se mantém na DCP.
- Contribui para o aumento do reconhecimento da DCP, doença globalmente subdiagnosticada.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho.

Fontes de Financiamento

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

Proteção de Pessoas e Animais

Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos responsáveis da Comissão de Investigação Clínica e Ética e de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

Confidencialidade dos Dados

Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de doentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos doentes incluídos no estudo, que são acompanhados na consulta de pneumologia pediátrica e possibilitaram que fosse feito estudo genético em contexto de projeto de investigação.

Referências

1. Shapiro AJ, Zariwala MA, Ferkol T, Davis SD, Sagel SD, Dell SD, et al. Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCD foundation consensus recommendations based on state of the art review. *Pediatr Pulmonol* 2016;51:115-32.
2. Werner C, Onnebrink JG, Omran H. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Cilia* 2015;4:2.
3. Lucas JL, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2017;49:1601090.
4. Lucas JS, Leigh MW. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Searching for a gold standard. *Eur Respir J* 2014;44:1418-22.
5. Haver K. The time is right for an international primary ciliary dyskinesia disease registry. *Eur Respir J* 2017;49:1602143.

6. Goutaki M, Maurer E, Halbeisen FS, Amirav I, Barbato A, Behan L, et al. The international primary ciliary dyskinesia cohort (iPCD Cohort): Methods and first results. *Eur Respir J* 2017;49:1601181.

7. Rumman N, Jackson C, Collins S, Goggin P, Coles J, Lucas JS. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Potential options for resource-limited countries. *Eur Respir Rev* 2017;26:160058.

8. Behan L, Dunn Galvin A, Rubbo B, Masefield S, Copeland F, Manion M, et al. Diagnosing primary ciliary dyskinesia: An international patient perspective. *Eur Respir J* 2016;48:1096-107.

9. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli M-PF, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *Eur Respir J* 2010;36:1248-58.

10. Fermeiro J, Bandeira T, Lobo L, Pereira L. Discinesia ciliar primária revisitada: A propósito de três casos clínicos. *Rev Port Pneumol* 2010;16:837-47
11. Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, Hogg C, Carroll M, Evans HJ, et al. PICADAR: A diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2016;47:1103-12.
12. American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-30.
13. Marthin JK, Nielsen KG. Hand-held tidal breathing nasal nitric oxide measurement: A promising targeted case-finding tool for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *PLoS One* 2013;8:e57262.
14. Raidt J, Wallmeier J, Hjej R, Onnebrink JG, Pennekamp P, Loges NT, et al. Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2014;44:1579-88.
15. Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen CT, Loges NT, Pennekamp P, Menchen T, et al. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Genet* 2014;46:646-51.
16. Kouis P, Yiallourous PK, Middleton N, Evans JS, Kyriacou K, Papatheodorou SI. Prevalence of primary ciliary dyskinesia in consecutive referrals of suspect cases and the transmission electron microscopy detection rate: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Res* 2017;81:398-405
17. Jackson CL, Behan L, Collins SA, Goggin PM, Adam EC, Coles JL, et al. Accuracy of diagnostic testing in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2016;47:837-48.
18. Olin JT, Burns K, Carson JL, Metjian H, Atkinson JJ, Davis SD, et al. Diagnostic yield of nasal scrape biopsies in primary ciliary dyskinesia: A multicenter experience. *Pediatr Pulmonol* 2011;46:483-8.
19. Kott E, Legendre M, Copin B, Papon JF, Dastot-Le Moal F, Montantin G, et al. Loss-of-function mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects. *Am J Hum Genet* 2013;93:561-70.
20. Lucas JS, Chetcuti P, Copeland F, Hogg C, Kenny T, Moya E, et al. Overcoming challenges in the management of primary ciliary dyskinesia: The UK model. *Paediatr Respir Rev* 2014;15:142-5.
21. Ministérios da Saúde, da Educação e Ciência e da Solidariedade, Emprego e Segurança Social. Estratégia integrada para as doenças raras 2015-2020. Despacho n.º 2129-B/2015, Diário da República. 2.ª série, N.º 41, 27 de fevereiro de 2015.