

Traduzione italiana curata da:

Dr. *Cirilli Natalia* – Centro Fibrosi Cistica Regione Marche

Dr. *Corbetta Carlo* – Centro Screening Neonatale Regione Lombardia

## **Evidence Based Guidelines for the Performance of Sweat Test for the Investigation of Cystic Fibrosis in the UK (Update November 2003)**

Report dal Gruppo di Lavoro Multidisciplinare con rappresentanti da:

Association of Clinical Biochemists  
British Paediatric Respiratory Society  
British Thoracic Society  
Cystic Fibrosis Trust  
Royal College of Paediatrics and Child Health  
Royal College of Pathologists  
UK National Quality Assessment Schemes

Queste Linee Guida sono state formalmente valutate e approvate dal  
Royal College of Paediatrics and Child Health  
([www.rcpch.ac.uk](http://www.rcpch.ac.uk))

Novembre 2003

Contattare:

Dr. Anne Green,  
Consultant Paediatric Biochemist  
Birmingham Children's Hospital,  
Steelhouse Lane,  
BIRMINGHAM,  
B4 6NH.  
Tel.: (0121) 333 9922  
Fax: (0121) 333 9911  
Email: [anne.green@bch.nhs.uk](mailto:anne.green@bch.nhs.uk)

Key words:     sweat test  
                  Cystic Fibrosis

Sweat Test Guidelines: [www.acb.org.uk](http://www.acb.org.uk)

### **RINGRAZIAMENTI**

Questo gruppo è molto grato a tutti gli sponsors di queste linee guida, a tutti i recensori per i loro utili commenti e suggerimenti, allo Specialists Advisory Group (Paediatrics) of UK National External Quality Assurance Schemes per aver stimolato l'idea di redigere questo documento e anche a tutti i professionisti per il loro interesse e i loro utili commenti durante tutto il lavoro.

## ABBREVIAZIONI

ACB	Association of Clinical Biochemists
BTS	British Thoracic Society
CPA	Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd.
CF Trust	Cystic Fibrosis Trust
NCCLS	US National Committee for Clinical Laboratory Standards
NEQAS	National External Quality Assurance Schemes
RCPATH	Royal College of Pathologists
RCPCH	Royal College of Paediatrics and Child Health

## CONTENUTO

GRUPPO DI SVILUPPO DELLE LINEE GUIDA .....	3
NOTE PER GLI UTILIZZATORI .....	3
REVIEW E AGGIORNAMENTI .....	4
SCHEMA DI CLASSIFICAZIONE DELLE RACCOMANDAZIONI.....	4
INDICE DELLE RACCOMANDAZIONI .....	7
REPORT DELLE LINEE GUIDA .....	15
INTRODUZIONE .....	15
OBIETTIVO .....	16
SCOPO .....	16
EVIDENZE E RACCOMANDAZIONI.....	17
1. Informazioni al paziente .....	17
Condizioni del paziente.....	17
3. Raccolta del sudore .....	18
<b>3.1.1 Evitare la contaminazione</b> .....	19
<b>3.1.2 Numero di campioni</b> .....	19
3.2.4 Sicurezza: .....	24
4. Analisi del sudore.....	29
5. Qualità.....	35
6. Intervalli di riferimento e interpretazione .....	40
7. Responsabilità del test e della formazione.....	48
8. Raccomandazioni per l'audit .....	50
9. Raccomandazioni per ulteriori indagini .....	50
BIBLIOGRAFIA.....	51
PROCESSO DI SVILUPPO DELLE LINEE GUIDA .....	57
CLASSIFICAZIONE DELLE EVIDENZE E DELLE RACCOMANDAZIONI .....	57
REVISIONE SISTEMATICA .....	59
CONSULTAZIONE E REVISIONE DA PARTE DI PARI .....	61
APPENDICI .....	63
APPENDICE 1 .....	63
APPENDICE 2a .....	65
APPENDICE 2b .....	71

## GRUPPO DI SVILUPPO DELLE LINEE GUIDA

<b>Presidente</b>	<b>Posizione</b>	<b>Rappresentante</b>
Dr. Anne Green	Primario di Biochimica, Birmingham Children's Hospital NHS Trust	NEQAS – cattedra al Paediatric Specialist Advisory Group (1997- 2001)
<b>Membri</b>		
Prof. Stuart Elborn	Primario di Medicina, Belfast City Hospital, Belfast	British Thoracic Society Cystic Fibrosis Trust
Mr. Mike N. Fahie-Wilson	Biochimico Capo, Southend Hospital, Westcliff-on-sea	Association of Clinical Biochemists
Dr. Jean M. Kirk	Primario di Biochimica, Royal Hospital for Sick Children, Edinburgh, Lothian University Hospital, NHS Trust	Royal College of Pathologists
Dr. Colin E. Wallis	Primario di Pediatria, Great Ormond Street Hospital, London	Royal College of Paediatrics and Child Health
Dr. Peter Weller	Primario di Pediatria e Medicina Respiratoria, Birmingham Children's Hospital NHS Trust	Royal College of Paediatrics and Child Health British Paediatric Respiratory Society

### **Segreteria:**

Mrs Mary Bowling,  
Department of Clinical Chemistry,  
Birmingham Children's Hospital NHS Trust,  
Steelhouse Lane,  
Birmingham,  
B4 6NH

### **NOTE PER GLI UTILIZZATORI**

Si intende che le raccomandazioni contenute in queste Linee Guida verranno adottate per uso locale in Inghilterra laddove si esegua il test del sudore nell'ambito delle indagini per la Fibrosi Cistica. E' importante che ne scaturisca un dibattito tra tutti coloro che si occupano di salute pubblica (chimico clinici, pediatri, pneumologi, infermieri che si occupano di FC), cosicché si possano ricavare ed implementare specifiche linee guida locali.

Le linee guida sono di proprietà delle società o gruppi elencati nella prima pagina, ma possono essere copiate per uso locale.

Per dettagli su dove ottenere copie, contattare:

Dr. Anne Green,  
Consultant Paediatric Biochemist  
Birmingham Children's Hospital,  
Steelhouse Lane,  
BIRMINGHAM,  
B4 6NH.

Tel.: (0121) 333 9922

Fax: (0121) 333 9911

Email: [anne.green@bch.nhs.uk](mailto:anne.green@bch.nhs.uk)

## **REVIEW E AGGIORNAMENTI**

Questa linea guida è stata distribuita dal Gruppo di lavoro in bozza nel Luglio 2002 e, nella versione definitiva nel Novembre 2003, dopo aver incorporato i commenti scaturiti dalla valutazione formale da parte del Royal College of Paediatrics and Child Health.

Laddove il livello di una raccomandazione fosse variato in seguito al processo di valutazione, è stato evidenziato.

### Valutazione del Royal College of Paediatrics and Child Health

Il collegio, attraverso revisori indipendenti, ha esaminato le raccomandazioni di livello B nel contesto degli lavori originali. Le raccomandazioni cui il gruppo di lavoro aveva assegnato livello C, non sono state valutate.

Il processo di valutazione ha evidenziato che i soli database elettronici consultati erano Medline e Cochrane e che quindi si rende necessario un pronto aggiornamento della revisione della letteratura. E' stato pianificato di revisionare le Linee Guida Nel 2005

Si sollecitano commenti intesi ad assistere il processo di revisione; tutta la corrispondenza può essere inviata a:

Dr. Anne Green,  
Consultant Paediatric Biochemist  
Birmingham Children's Hospital,  
Steelhouse Lane,  
BIRMINGHAM,  
B4 6NH.  
Tel.: (0121) 333 9922  
Fax: (0121) 333 9911  
Email: [anne.green@bch.nhs.uk](mailto:anne.green@bch.nhs.uk)

## **SCHEMA DI CLASSIFICAZIONE DELLE RACCOMANDAZIONI**

I criteri impiegati per classificare le raccomandazioni in questo documento sono basate su quelli usati dalla US Agency for Health Care Policy and Research (AHCPR) <sup>(1)</sup>, e pubblicati dallo Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) <sup>(2)</sup>.

## Livello dell'evidenza:

Livello	Classificazione dell'evidenza (basato sui criteri dell'AHCRP 1992)
Ia	evidenza da meta-analisi e da trial controllati, randomizzati
Ib	evidenza da almeno 1 trial controllato, randomizzato
IIa	evidenza da almeno 1 studio controllato ben strutturato, non randomizzato
IIb	evidenza da almeno 1 altro tipo di studio descrittivo, quasi sperimentale
III	evidenza da studi descrittivi, ben strutturati, non sperimentali (studi comparativi, studi di correlazione e case studies)
IV	evidenza da report di comitati di esperti, o opinioni e/o esperienze cliniche di professionisti autorevoli

## Classificazione delle raccomandazioni

Grado	Tipo di raccomandazione ((basata sui criteri dell'AHCP 1992)
A (livelli Ia e Ib)	richiede almeno 1 trial controllato, randomizzato tra tutte le pubblicazioni di sostanziale buona qualità e consistenza che parlano della raccomandazione
B (livelli IIa, IIb, III)	richiede la disponibilità di studi clinici ben condotti, ma non di trial clinici randomizzati sull'argomento trattato dalla raccomandazione
C (livello IV)	richiede l'evidenza scaturita da report di comitati di esperti o opinioni e/o esperienze cliniche di professionisti autorevoli. Indica l'assenza di studi direttamente applicabili di buona qualità

Il processo di sviluppo delle raccomandazioni si è svolto sotto la guida dell' RCPCH (3); ulteriori dettagli sono forniti nella sezione dove si illustra il processo di sviluppo delle linee guida.

## Bibliografia

1. Agency for Health Care Policy and Research. Acute pain management, operative or medical procedures and trauma 92-0032. Clinical practice guidelines. Rockville, Maryland, USA: Agency for Health Care Policy and Research Publications, 1992.

2. SIGN Guidelines: An introduction to SIGN methodology for the development of evidence-based clinical guidelines. Scottish Intercollegiate Network (SIGN). SIGN Publication Number 39, July 1999.
3. Standards for the Development of Clinical Guidelines in Paediatrics and Child Health: Role of the Royal College of Paediatrics and Child Health. Report of the Quality of Practice Committee, December 1998. 2<sup>nd</sup> edition November 2001.

## INDICE DELLE RACCOMANDAZIONI

Sono elencati specifici riferimenti per le raccomandazioni di grado B

Informazioni al paziente	Grado	Rif.
<ul style="list-style-type: none"> <li>E' buona pratica clinica preparare efficacemente il paziente e, dove appropriato, il genitore prima del test. Il consenso informato dovrebbe essere redatto in accordo con i protocolli locali</li> <li>Le informazioni da fornire prima del test dovrebbero almeno comprendere le ragioni per cui il test viene eseguito, come viene eseguito, i rischi associati al test, cosa prova il paziente durante il test e dettagli relativi chi contattare per il test e per i risultati finali. Un volantino di esempio per i pazienti/parenti viene fornito (vd. documento 1 in Appendice).</li> </ul>	C	
<b>Condizioni del paziente</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Il test del sudore può essere eseguito dopo 2 settimane di età nei bambini con peso superiore a 3 Kg che sono normalmente idratati e senza malattia sistemica significativa</li> <li>Il test del sudore può essere tentato nei neonati a termine dopo 7 giorni di età, se ritenuto clinicamente necessario, ma deve essere ripetuto nel caso in cui la quantità di sudore risultasse insufficiente</li> <li>Il test del sudore deve essere rimandato nei bambini disidratati, con patologie sistemiche, o affetti da eczema nel sito di stimolazione</li> <li>Il test del sudore dovrebbe essere rimandato nei bambini edematosi o in trattamento corticosteroideo</li> <li>Il test del sudore non dovrebbe essere eseguito in soggetti in O<sub>2</sub> terapia con dispositivo aperto. Sono esclusi i bambini sotto campana o con cannule nasali</li> <li>Il test del sudore può essere eseguito in soggetti in trattamento con flucloxacillina</li> </ul>	C C C C C C*	18
<b>Raccolta del sudore</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>La superficie flessoria di entrambi gli avambracci è la sede preferita per la raccolta del sudore. Si devono prendere in considerazione altre sedi, nel caso in cui entrambe le braccia siano eczematose, troppo piccole o non idonee per altre ragioni. Altre sedi scelte con successo includono la parte alta delle braccia, le cosce e la schiena</li> <li>Grande attenzione va posta in tutte le fasi della procedura per impedire la contaminazione (vd. SOP di esempio)</li> <li>In risposta ad una richiesta di test del sudore, è sufficiente un solo test</li> </ul>	C C Non classificata*	12, 20

\* La classificazione di questa raccomandazione cambiava secondo la valutazione del Royal College of Paediatrics and Child Health

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Il generatore deve essere alimentato a batteria e dovrebbe avere un salvavita <ul style="list-style-type: none"> <li>– Durante la iontoforesi si dovrebbe monitorare la corrente, dove possibile. I sistemi Wescor, dal modello 3600 in poi, non hanno un amperometro ma un appropriato dispositivo salvavita</li> <li>– Il generatore e gli elettrodi dovrebbero essere periodicamente verificati, mantenuti e le registrazioni conservate</li> <li>– La sicurezza elettrica di tutti i generatori deve essere verificata annualmente</li> </ul> </li> </ul>	<b>C</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gli elettrodi dovrebbero essere di dimensione e curvatura tali da adattarsi comodamente all'arto del paziente <ul style="list-style-type: none"> <li>– Essi sono più comunemente di rame o di acciaio</li> <li>– Gli elettrodi dovrebbero essere fermamente assicurati in posizione ai tamponi di supporto degli elettroliti o ai gel con delle fasce regolabili per adattarsi al paziente (Es: velcro o gomma)</li> <li>– Gli elettrodi devono essere regolarmente puliti e ispezionati e buttati se mostrano buchi o irregolarità</li> </ul> </li> </ul>	<b>C</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• La scelta di un nuovo equipaggiamento e il mantenimento dell'equipaggiamento esistente, deve essere conforme allo standard CPA (o standard equivalente)</li> </ul>	<b>C</b>	

<p><b>Soluzioni di elettroliti</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Le soluzioni acquose o i dischi di gel Wescor che contengono nitrato di pilocarpina a 2/5 g/L sono raccomandati per entrambi gli elettrodi. Soluzioni alternative (Es: solfato di magnesio) possono essere usate al catodo</li> <li>Le soluzioni contenenti sodio o cloro dovrebbero essere evitate perché contaminerebbero la raccolta</li> <li>Soluzioni acide non tamponate non dovrebbero essere usate a causa dell'aumentato rischio di bruciature</li> <li>Gli elettroliti usati per la iontoforesi devono o essere parte di un dispositivo medico (Es: dischi di pilogel della Wescor) o forniti da un produttore riconosciuto di prodotti medici "senza licenza" (vedere pag.27). Le soluzioni non devono essere prodotte da laboratori ospedalieri</li> </ul>	<p><b>B</b></p> <p><b>C</b></p> <p><b>B</b></p> <p><b>C</b></p>	<p><b>29, 30</b></p> <p><b>22</b></p>
<p><b>Supporti per gli elettroliti</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Usare per gli elettroliti dei tamponi spessi per minimizzare il rischio di ustioni con soluzioni acide</li> <li>I tamponi della Hospital Lint BPC Plain da 500 gr ripiegati per avere uno spessore da 4 a 8 volte (spesso più di 1 cm) sono raccomandati come serbatoio di elettroliti per i sistemi di raccolta su carta da filtro. Il tampone dovrebbe essere almeno 1 cm più largo dell'elettrodo in tutte le direzioni per impedire il contatto dell'elettrodo con la cute. Esso può essere inserito in sacchetti cuciti adatti a contenere l'elettrodo e prevenire il contatto con la cute. I tamponi devono essere saturati con gli elettroliti imbevendoli nelle soluzioni di elettroliti prima di metterli a contatto con la cute del paziente.</li> <li>I sistemi ibridi, come gli elettrodi Wescor con soluzioni acquose di elettroliti, o dischi di gel Wescor con elettrodi non Wescor non dovrebbero essere usati</li> </ul>	<p><b>B</b></p> <p><b>Non classificata*</b></p> <p><b>Non classificata*</b></p>	<p><b>22</b></p>
<p><b>Iontoforesi: durata, corrente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Quando le soluzioni di elettroliti sono applicate ai tamponi, si dovrebbe applicare una corrente di 0,5 mA che viene poi aumentata gradualmente fino ad un massimo di 4 mA. Raggiunti i 4 mA, la corrente dovrebbe essere mantenuta per un minimo di 3 minuti fino ad un massimo di 5 minuti. Tempi di stimolazione più lunghi non dovrebbero essere necessari per aumentare la quantità di sudore, se si garantisce un buon contatto elettrico, dato da un'adeguata manutenzione degli elettrodi e da un'adeguata saturazione dei tamponi</li> <li>Quando si usano i sistemi Wescor bisogna seguire le raccomandazioni del costruttore riguardo i tempi di stimolazione e la corrente. Le raccomandazioni varieranno a seconda del modello usato</li> <li>Per entrambi i sistemi il paziente deve essere tenuto sotto stretta osservazione durante la stimolazione</li> </ul>	<p><b>B</b></p> <p><b>C</b></p> <p><b>C</b></p>	<p><b>24, 29, 34 36, 40, 41</b></p>
<p><b>Mezzo di raccolta</b></p>		

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durante la raccolta il sudore dovrebbe essere protetto da contaminazione ed evaporazione (vd. SOP di esempio)</li> <li>• Il sudore dovrebbe essere raccolto su carta prepesata priva di sodio e cloro, o su raccoglitori Wescor</li> <li>• La dimensione della carta da filtro dovrebbe essere approssimativamente uguale alla superficie dell'area stimolata, ovvero alla dimensione del tampone di supporto per gli elettroliti</li> <li>• La carta da filtro dovrebbe essere ricoperta con materiale impermeabile almeno di 1 cm più largo in tutte le direzione della carta da filtro</li> <li>• Il materiale impermeabile dovrebbe essere sigillato alla cute del paziente usando un opportuno nastro adesivo</li> <li>• La carta da filtro e il lato interno del materiale impermeabile non deve mai venire in contatto diretto con le mani dell'operatore</li> <li>• I sistemi di raccolta Wescor dovrebbero essere usati in accordo con le istruzioni del costruttore, prendendo precauzioni per impedire il contatto diretto della superficie di raccolta del sudore con le mani dell'operatore</li> </ul>	<p>C</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>C</p>	
<p><b>Tempo di raccolta</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Il sudore dovrebbe essere raccolto per non più di 30 minuti e non meno di 20 minuti</li> <li>• L'elettrodo Orion non dovrebbe essere usato</li> </ul>	<p>B</p> <p>B</p>	<p>20, 29, 31, 32, 36, 41, 49 50, 51, 52, 29, 53</p>
<p><b>Analisi del sudore</b></p> <p><b>Fase pre-analitica</b></p>		
<p><b>Conservazione prima dell'analisi</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Durante la raccolta, il trasporto e l'analisi, si dovrebbe fare di tutto per minimizzare l'evaporazione del campione</li> </ul>	<p>C</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fosse necessario conservare i campioni di sudore su carta da filtro prima dell'analisi, tenerli a 4°C per un massimo di 3 giorni in contenitori di dimensioni opportune e a tenuta stagna in modo da non consentire perdite o evaporazione del campione</li> <li>• Il sudore liquido raccolto con il sistema Wescor può essere conservato nei contenitori sigillati della Wescor fino a 72 ore a 4°C. Vanno bene anche i capillari in vetro da ematocrito sigillati con plastilina, stando attenti a mantenere un vuoto d'aria tra il sudore e la plastilina</li> <li>• Il sudore può essere raccolto in luoghi lontani e successivamente essere trasportato in Laboratorio per l'analisi, facendo attenzione ai dettagli relativi alla conservazione</li> </ul>	<p>B</p> <p>B</p> <p>B</p>	<p>56</p> <p>55, 57</p> <p>conclusione dei 2 paragrafi precedenti</p>
<p><b>Pesatura</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Usare sempre la stessa bilancia</li> <li>• Per pesare il sudore usare una bilancia con sensibilità pari a 0,0001 gr</li> <li>• Il sudore raccolto su carta da filtro dovrebbe essere pesato ed analizzato prima possibile</li> </ul>	<p>C</p> <p>C</p> <p>C</p>	

<p><b>Definizione di campione adeguato</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>La velocità di secrezione del sudore, intesa come velocità media calcolata durante il periodo di raccolta, non dovrebbe essere inferiore ad 1gr/m<sup>2</sup>/min. Le raccolte con velocità di secrezione inferiore a questo valore non dovrebbero essere analizzate. I campioni insufficienti non dovrebbero essere raccolti in pool. Ripetere il test da capo.</li> </ul>	<b>B</b>	<b>12, 29, 32, 49, 52, 58</b>
<b>Analisi</b>		
<p><b>Eluizione del sudore dalla carta da filtro</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Quando il sudore viene raccolto su carta da filtro (sezione 3.2.1), dovrebbe essere eluito per almeno 40 minuti</li> </ul> <p><b>Analiti</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Si deve misurare la concentrazione di cloro nel sudore</li> <li>Il sodio non deve essere il solo o principale analita misurato</li> <li>Non è raccomandata la misura del potassio</li> <li>Le misure conduttivimetriche su sudore per indagini in FC richiedono ulteriore studio. Se si misura la conduttività, anche il cloro su sudore dovrebbe essere misurato fino a quando non vengano stabiliti i relativi meriti delle misure conduttivimetriche</li> <li>La misura dell'osmolalità del sudore non è raccomandata</li> </ul>	<b>C</b>  <b>B</b> <b>B</b>  <b>B</b>  <b>B</b>  <b>B</b>	  <b>62,63,64,65</b> <b>62,63,64,65</b>  <b>66</b>  <b>70,71,72,73,74</b>  <b>55,70</b>
<p><b>Metodologia</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>La colorimetria, la coulometria e i moduli ISE sono metodi soddisfacenti per il dosaggio del cloro nel sudore</li> <li>La fotometria di fiamma o i moduli ISE sono metodi soddisfacenti per il dosaggio del sodio nel sudore</li> <li>La misura della conduttività usando il sistema Wescor è un metodo analitico soddisfacente</li> </ul>	<b>B</b>  <b>B</b>  <b>B</b>	<b>57,67,70</b>  <b>67,77,78</b>  <b>67,70</b>
<p><b>Modello di referto</b></p> <p>Il referto dovrebbe riportare:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Identificazione completa del paziente</li> <li>Data e ora del test, data e ora del referto</li> <li>Peso/volume del sudore raccolto e peso/volume minimo accettabile secondo i parametri locali</li> <li>Risultati analitici (mmol/L) <b>dovrebbe essere indicato in modo esplicito nel referto quale analita(i) è stato misurato(i)</b> cioè: cloro sodio conduttività (equivalenti di cloruro di sodio)</li> <li>Intervalli di riferimento (vd. sezione 6)</li> <li>Interpretazione dei risultati (vd. sezione 6)</li> <li>Raccomandazioni per ripetere il test ove appropriato (vd. sezione 6.9)</li> </ol>	<b>C</b>	
<b>Qualità</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Il sudore che è stato soggetto a contaminazione o evaporazione non deve essere analizzato</li> <li>Il range analitico dei metodi impiegati deve coprire gli intervalli di concentrazione dei soggetti normali e dei</li> </ul>	<b>C</b>  <b>C</b>	

<p>soggetti con fibrosi cistica</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• I metodi analitici devono essere ampiamente documentati come procedure operative standard (SOP) per uniformarsi allo standard CPA (Clinical Pathology Accreditation)(o standard equivalente). La SOP deve includere il metodo(i) analitico(i), le procedure di controllo di qualità, la refertazione, gli aspetti relativi all'interpretazione dei risultati e alla sicurezza. In appendice c'è un esempio di SOP (vd. Appendice, Documenti 2a e 2b)</li> <li>• Ci deve essere una procedura di controllo di qualità interno (diversa dalla procedura di calibrazione) a 2 concentrazioni (normale e intermedia o patologica) per ciascuna analisi</li> <li>• I metodi analitici dovrebbero ciascuno avere un CV tra batch del 5% (o meno) alla concentrazione di 40-50 mmol/L</li> <li>• Il laboratorio deve partecipare ad uno schema di valutazione esterna di qualità appropriato</li> <li>• Se le concentrazioni di sodio e cloro sono molto discrepanti, il test dovrebbe essere ripetuto</li> <li>• Risultati non fisiologici, cioè con cloro e sodio &gt;150 mmol/L, dovrebbero essere messi in discussione</li> <li>• Per la conduttività, si può usare un limite fisiologico superiore provvisorio di 170 mmol/L, in attesa di ulteriori evidenze</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>C</b></p> <p style="text-align: center;"><b>C</b></p> <p style="text-align: center;"><b>B</b></p> <p style="text-align: center;"><b>C</b></p> <p style="text-align: center;"><b>B</b></p> <p style="text-align: center;"><b>B</b></p> <p style="text-align: center;"><b>C</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>70,63,69,86,87,88</b></p> <p style="text-align: center;"><b>12</b></p> <p style="text-align: center;"><b>12,90</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Campioni di sudore non idonei (cioè, con peso o volume insufficiente) non dovrebbero superare il 10% dell'intera popolazione testata (escludendo i campioni ripetuti e quelli eseguiti su pazienti malati/molto piccoli). Il target dovrebbe essere fissato al 5%</li> <li>• La performance dell'intera procedura del test del sudore dovrebbe essere rivista con regolarità. Questo dovrebbe includere: <ul style="list-style-type: none"> <li>– campioni insufficienti, registrati come % dei campioni totali e per operatore</li> <li>– dati fuori controllo (% dei valori fuori dal range definito per il CQI)</li> <li>– performance nella verifica esterna di qualità</li> </ul> </li> <li>• Il laboratorio dovrebbe collaborare con i medici per verificare con regolarità i risultati del test del sudore, in particolare, i campioni ripetuti, le diagnosi e l'esito dei risultati positivi e intermedi (vd. sezione 8)</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>C</b></p> <p style="text-align: center;"><b>C</b></p> <p style="text-align: center;"><b>C</b></p>	

**Interpretazione degli elettroliti nel sudore**

Per l'interpretazione sono raccomandate le seguenti definizioni:

- una concentrazione di cloro nel sudore > 60 mmol/L supporta la diagnosi di FC
- una concentrazione di cloro nel sudore intermedia, tra 40 e 60 mmol/L, è suggestiva, ma non diagnostica per FC
- una concentrazione di cloro nel sudore < 40 mmol/L è normale e c'è una bassa probabilità di FC
- il sodio non dovrebbe essere interpretato senza il valore del cloro
- mancando ulteriori dati sulle misure di conduttività, un valore < 60 mmol/L (equivalenti di NaCl) è improbabile che sia associato con FC. Valori > 90 mmol/L supportano una diagnosi di FC
- la fibrosi cistica non dovrebbe essere diagnostica basandosi solamente sulla misura della conduttività

**B****B****B****B****B****B****62,63,95****96,97,98****99,100****62****54,69,70,71**



## REPORT DELLE LINEE GUIDA

### INTRODUZIONE

Background/esigenza di una linea guida

La Fibrosi Cistica è la più frequente malattia autosomica recessiva che accorcia la vita tra la popolazione del Nord Europa, con un'incidenza di 1:2500 nati vivi. E' meno comune tra i negri d'America (1:15.000)<sup>(2)</sup> e rara tra gli orientali (1:90.000)<sup>(3)</sup>. L'incidenza nella popolazione asiatica è meno conosciuta, ma probabilmente intorno a 1:10.000<sup>(4)</sup>.

Le manifestazioni tipiche o classiche dell'infezione respiratoria e dell'insufficienza pancreatica esocrina con elevata concentrazione di elettroliti nel sudore sono dovute alle mutazioni del gene della CFTR (cistic fibrosis transmembrane conductance regulator) sul cromosoma 7. Oltre 1000 mutazioni in questo locus sono associate con FC e con altri disordini correlati al CFTR.

Le caratteristiche cliniche che possono essere associate con un fenotipo atipico includono: patologia sino-polmonare, insufficienza pancreatica, pancreatite idiopatica, azoospermia ostruttiva isolata dovuta all'assenza dei vasi deferenti, sindrome da perdita di sali. Tali pazienti possono avere una sola mutazione identificata.

Il test del sudore, una misurazione quantitativa degli elettroliti nel sudore, è ancora oggi il test di riferimento per la diagnosi clinica di FC. Indicazioni per il test del sudore includono:

- fenotipo suggestivo di FC
- storia familiare di FC
- test di screening neonatale per FC positivo
- sospetto di un fenotipo atipico

Nella maggior parte dei pazienti FC con caratteristiche tipiche e mutazioni identificate, il test del sudore è diagnostico. Nell'FC atipica, dove le mutazioni FC sono state identificate, il test del sudore può risultare intermedio, ma è di solito utile per formulare la diagnosi<sup>(5,6)</sup>. La diagnosi di FC può rimanere incerta in quei pazienti con caratteristiche cliniche suggestive e test del sudore intermedio e mutazioni non identificate. Molto raramente il test del sudore è normale in un paziente con genotipo FC<sup>(7,8,9)</sup>.

Il test del sudore rimane il test di laboratorio chiave per supportare la diagnosi di FC. E' d'importanza critica che il test del sudore venga eseguito accuratamente, dosando gli elettroliti rilevanti per consentire l'interpretazione clinica dei risultati. Il test del sudore viene eseguito con regolarità in circa 180 laboratori in tutta l'Inghilterra. Nella maggior parte dei casi, la raccolta e l'analisi vengono eseguite in un Dipartimento di Chimica Clinica.

Un audit in Inghilterra ha dimostrato un'ampia variabilità nella pratica e negli standard<sup>(10)</sup>. Suscitano riflessioni: la mancanza di un adeguato controllo di qualità dei metodi analitici; un cospicuo numero di laboratori misura solo il sodio; la variabilità negli intervalli di riferimento; la mancanza di audit; tracce sporadiche di eventi avversi a carico del paziente.

Queste evidenze hanno stimolato lo Special Advisory Group for Paediatric Investigations dello UK NEQAS a istituire uno schema di verifica esterna di qualità per l'analisi del sudore e la necessità di linee guida per l'esecuzione del test del sudore.

## OBIETTIVO

Produrre linee guida su come eseguire il test del sudore per diagnosticare la fibrosi cistica in Inghilterra.

Contenuto:

- ◆ organizzazione/offerta assistenziale per il paziente (compresa l'informazione al paziente/genitori)
- ◆ raccolta del sudore (compresa l'idoneità del soggetto)
- ◆ analisi del sudore
- ◆ qualità del test
- ◆ interpretazione dei risultati (compresi i falsi positivi; le indicazioni per ripetere il test; l'uso di altri test)
- ◆ chi dovrebbe eseguire la raccolta e l'analisi
- ◆ verifica della competenza e necessità di formazione

## SCOPO

Le linee guida coprono i seguenti aspetti del test del sudore e vengono applicati a soggetti di tutte le età.

Informazione al paziente

Idoneità del soggetto

- fisiologia
- stato clinico
- esclusioni/restrizioni

Raccolta del sudore

- sito di raccolta
- metodi di stimolazione ed equipaggiamento
- mezzo di raccolta/tempo/contenitori

Analisi del sudore

- pesatura
- eluizione
- analiti
- metodi analitici
- referto

Qualità

- controllo di qualità interno
- verifica esterna di qualità
- audit

Valori di riferimento e interpretazione

- definizioni
- falsi positivi
- indicazioni per ripetere il test
- uso di altri test

Responsabilità dell'esecuzione del test e formazione del personale

## EVIDENZE E RACCOMANDAZIONI

### 1. Informazioni al paziente

#### Evidenza

Una ricerca sistematica riguardo le informazioni fornite al paziente in preparazione al test ha rivelato che non ci sono pubblicazioni randomizzate, controllate o evidence based. Non ci sono studi che si occupano del contenuto o del formato delle informazioni fornite al paziente.

Una recente verifica nei laboratori negli USA che verrà pubblicata entro quest'anno<sup>(11)</sup> ha evidenziato che su 800 laboratori che effettuano il test del sudore: il 10% consegna un'informazione scritta; l'1% ha un supporto video; il 30% ha formalizzato un'informazione verbale.

Livello di evidenza IV

Un'inchiesta informale eseguita presso i più grandi centri in Inghilterra ha rivelato che ca. il 50% dei laboratori ha dei fogli informativi locali<sup>(12)</sup>.

I fogli informativi sono considerati una buona pratica clinica e strumenti accettati per distribuire informazioni, seppure con dei limiti:

- i pazienti/parenti possono essere in una situazione o in un ambiente che non li aiuta a recepire le informazioni fornite
- il personale che ha la responsabilità di distribuire il foglio con le informazioni può non essere in grado di rispondere ad eventuali domande sollevate dal paziente/parente
- ci possono essere difficoltà di linguaggio

Livello di evidenza IV

### Condizioni del paziente

Ci sono numerosi fattori soggettivi che possono influenzare la sudorazione ed i risultati del test del sudore. Nelle situazioni in cui il test del sudore si è dimostrato inapplicabile, l'indagine genetica deve essere il test diagnostico di scelta.

#### Evidenza

I neonati pretermine non sudano nei primi 7-14gg dopo la nascita, ma molti neonati a termine sudano fin dal primo giorno<sup>(13)</sup>.

Livello di evidenza III

Nei neonati a termine il contenuto di sodio (e cloro) può essere elevato nei primi 7gg dopo la nascita, particolarmente nelle prime 48 ore<sup>(14)</sup>.

Livello di evidenza III

Il consenso sulla pratica clinica corrente evidenzia che può essere difficile raccogliere adeguate quantità di sudore dai neonati molto piccoli, specialmente sotto i 3Kg di peso.

Livello di evidenza IV

Gli elettroliti nel sudore possono essere elevati nei bambini sottopeso o disidratati e ridotti nei bambini in trattamento corticosteroidico sistemico o con edema<sup>(15,16)</sup>.

Livello di evidenza IV

Gli elettroliti nel sudore possono essere elevati se il sito di stimolazione e raccolta del sudore è affetto da eczema<sup>(17)</sup>.

Livello di evidenza IV

In un piccolo studio si è concluso che gli elettroliti nel sudore non sono influenzati dalla flucloxacillina<sup>(18)</sup>. Non ci sono dati per altri antibiotici.

Livello di evidenza IIb

Gli elettroliti nel sudore non sono influenzati da diuretici o da fluidi endovena, finché il paziente resta stabile<sup>(15)</sup>.

Livello di evidenza IV

Le linee guida dell'NCCLS<sup>(19)</sup> stabiliscono che non si può effettuare il test del sudore in pazienti in O<sub>2</sub> terapia con sistemi di distribuzione aperti: Sebbene il rischio di esplosione dovuta ad una scintilla elettrica sia un'eventualità remota, non deve essere trascurata. Non ci sono evidenze che supportano questa affermazione.

Livello di evidenza IV

### 3. Raccolta del sudore

Le sezioni che seguono forniscono raccomandazioni per la pratica e la relativa evidenza. La procedura tecnica è descritta in dettaglio nelle procedure operative standard di esempio (Appendice 2a e 2b)

#### **Evidenza**

##### **3.1 Sito di raccolta**

Il sottogruppo di Laboratorio inglese ha confermato che la maggior parte dei centri inglesi che effettuano il test del sudore utilizzano la superficie flessoria dell'avambraccio quale sito di raccolta<sup>(12)</sup>. Il catodo può essere posizionato in vari punti della superficie flessoria o estensoria dello stesso avambraccio o sulla parte alta del braccio. Schiena, torace e coscia sono impiegati con successo da alcuni centri<sup>(20)</sup>.

Livello di evidenza IV

### **3.1.1 Evitare la contaminazione**

Le linee guida NCCLS<sup>(19)</sup> forniscono istruzioni dettagliate come segue:

non stimolare il sudore in siti che sono vistosamente infiammati o sanguinanti. Usare garza o carta da filtro a basso contenuto di sodio e cloro. Lavare ed asciugare la cute del paziente a fondo. Non maneggiare direttamente con le dita il contenitore da pesare, il parafilm, il sito di raccolta o la carta da filtro per la raccolta. Usare sempre pinzette o guanti senza talco.

**Livello di evidenza IV**

### **3.1.2 Numero di campioni**

Pochi centri in Inghilterra effettuano sempre o talvolta 2 raccolte separate in risposta ad una richiesta di test del sudore<sup>(20)</sup>; questo è raccomandato anche nelle linee guida dell'NCCLS<sup>(19)</sup>. La ragione fornita è il controllo di qualità - una discrepanza tra i due risultati evidenzia una precisione inaccettabile nella performance dei test in duplicato. Un audit su 158 test in doppio (braccio dx, braccio sn) su pazienti FC in cura presso un centro inglese, ha rivelato che nessun paziente FC sarebbe sfuggito se il test fosse stato eseguito su un solo braccio. Un'analisi statistica (Altman Bland difference plot) dei dati ha mostrato che non c'è inaccuratezza tra le due braccia e un intervallo di confidenza al 95% per il cloro pari a 20 mmol/L.

**Livello di evidenza III**

L'analisi in doppio non identifica errori sistematici o contaminazioni dei reagenti o dei materiali usati in quella seduta.

**Livello di evidenza IV**

**Effettuare il test del sudore in duplicato comporta una dilatazione dei tempi di raccolta e il discomfort per il paziente, senza migliorare la resa diagnostica.**

**Livello di evidenza globale IV(\*)**

**(\*) sono state pubblicate altre 2 referenze (20a, 20b) dopo il completamento delle linee guida**

## **3.2 Stimolazione (metodi e strumenti)**

### **3.2.1 Strumentazione – Generatore ed elettrodi**

Il generatore, gli elettrodi e le soluzioni di elettroliti e i supporti devono essere capaci di fornire una corrente adeguata a stimolare la sudorazione tramite iontoforesi, senza compromettere la sicurezza del paziente a causa dell'eccessiva intensità di corrente.

Alcune vecchie sorgenti di energia usavano corrente AC con rischio di aritmie cardiache<sup>(21)</sup> che hanno condotto alle attuali raccomandazioni (gli elettrodi non devono mai attraversare il tronco; usare sempre di preferenza il braccio dx, invece del sinistro). Altre sorgenti di energia elettrica che consistevano in una semplice batteria con reostato non avevano un'uscita di sicurezza, portando ad un aumento di corrente se la resistenza della cute diminuiva, ad esempio quale risultato della formazione di bolle<sup>(21,22)</sup>. Essi quindi dipendevano da un aggiustamento manuale della corrente durante la procedura

iontoforetica. L'incorporazione di un resistore fisso in aggiunta al resistore variabile può limitare la corrente massima anche quando il generatore va in cortocircuito. Sono stati pubblicati i diagrammi dei circuiti elettrici<sup>(21)</sup> alcuni dei quali incorporano un circuito di sicurezza<sup>(23)</sup>. Attrezzature costruite artigianalmente dalla fisica medica o da un elettricista senza una verifica indipendente non possono più essere considerate rispondenti agli standard di sicurezza. I sistemi Wescor incorporano sia un salvavita per la corrente, che per le alte resistenze<sup>(24,25)</sup>, come pure i generatori della C&S Electronics<sup>(26)</sup>.

Livello di evidenza IV

Gli standard CPA<sup>(27)</sup> affermano: tutta la strumentazione deve essere sicura, pulite e mantenute. Si deve verificare se tutta la strumentazione è conforme ai "Requisiti di sicurezza per la strumentazione elettrica di misura, controllo e per uso laboratoristico". Ci sono procedure operative standard per la regolare manutenzione delle apparecchiature. Il Dipartimento deve avere una procedura per riferire eventuali incidenti ai dispositivi medici alle autorità predisposte.

Livello di evidenza IV

Le Linee Guida di Consenso esistenti affermano:

a. NCCLS<sup>(19)</sup>: se il generatore è controllato manualmente dovrebbe essere fornito un milliamperometro per consentire all'operatore di tenere la corrente sotto 4 mA. Il generatore dovrebbe essere alimentato a batteria. Un voltaggio di 22,5V è sufficiente, sebbene le sorgenti di energia controllate automaticamente possono richiedere un voltaggio più elevato. Gli elettrodi dovrebbero essere di rame o acciaio. Se più larghi di 2,5cmx2,5cm dovrebbero essere sufficientemente pieghevoli da adattarsi all'avambraccio o alla gamba del paziente. La superficie dovrebbe essere liscia e priva di irregolarità. Se si usano i dischi di gel, questi dovrebbero adattarsi strettamente all'elettrodo. Gli elettrodi di rame dovrebbero essere puliti ad ogni seduta con panno ruvido.

Livello di evidenza IV

b. Welsh<sup>(28)</sup>: l'apparecchio usato dovrebbe essere tipo Wescor o EMS. Lo strumento dovrebbe essere mantenuto secondo le istruzioni della ditta fornitrice con particolare attenzione agli aspetti legati alla sicurezza del paziente. Le registrazioni dell'ispezione degli elettrodi e della manutenzione devono essere tenute per ispezioni indipendenti, se richieste.

Livello di evidenza IV

Gli elettrodi sono stati costruiti con diversi materiali. Schwarz ha dimostrato la penetrazione di ioni metallici nei tamponi durante la iontoforesi<sup>(22)</sup>. Questo riguarda soprattutto piombo e rame, ma può essere minimizzato aumentando lo spessore del tampone con gli elettroliti.

Livello di evidenza IIb

**I dispositivi elettrici devono essere alimentati a batteria e dovrebbero incorporare un circuito di messa a terra per la sicurezza. Verificare con regolarità la funzionalità**

**dei dispositivi elettrici e degli elettrodi, effettuare la manutenzione degli stessi e conservarne le registrazioni.**

**Livello globale di evidenza IV**

3.2.2 Soluzioni di elettroliti:

Price<sup>(29)</sup> ha mostrato che concentrazioni crescenti di nitrato di pilocarpina da 0,5 a 5,0 g/L aumentavano la resa del sudore, ma diminuivano i valori di cloro. L'effetto era più marcato a concentrazioni < 1g/L.

**Livello di evidenza IIb**

Szabo<sup>(30)</sup> ha mostrato che non ci sono effetti sul cloro usando concentrazioni di nitrato di pilocarpina pari a 2,5, 5,0 e 7,5g/L.

**Livello di evidenza IIb**

Il nitrato di pilocarpina è universalmente usato quale fonte di pilocarpina all'anodo, sostituendo l'idrocloruro di pilocarpina<sup>(31)</sup> nella precedente letteratura. Le concentrazioni usate variano da 0,64g/L<sup>(31)</sup> a 15g/L<sup>(32)</sup>, con un singolo caso in cui è stata usata una concentrazione di 100g/L<sup>(33)</sup>.

**Livello di evidenza IV**

La soluzione di elettroliti al catodo è arbitraria e serve a completare il circuito elettrico. Sono state usate soluzioni 0,07N di bicarbonato di sodio<sup>(34)</sup>, 0,02N di acido solforico<sup>(31)</sup>, da 3 a 10g/L di solfato di potassio<sup>(22,35)</sup>, 10g/L di nitrato di sodio<sup>(36)</sup>. I sistemi Wescor con Pilogel usano nitrato di pilocarpina sia al catodo che all'anodo<sup>(32,37)</sup>. Evitare di usare soluzioni di elettroliti contenenti sodio e cloro per ridurre la possibilità di contaminare l'anodo sembrerebbe ragionevole, ma il fenomeno non è stato sufficientemente studiato.

**Livello di evidenza IV**

L'impiego di soluzioni alcaline come il bicarbonato di sodio si è dimostrato diminuire la probabilità di bruciature da acido<sup>(22,29)</sup>.

**Livello di evidenza IIb**

Da uno studio osservazionale in Inghilterra<sup>(38)</sup> è emerso che i centri che hanno risposto usavano 2-5g/L di nitrato di pilocarpina su garza, o carta da filtro o 5g/L di nitrato di pilocarpina su dischi di gel. Al catodo tutti i centri virtualmente usavano solfato di magnesio a varie concentrazioni (da 0,05 a 2,0 mol/L) o nitrato di pilocarpina come per l'anodo.

**Livello di evidenza IV**

Le Linee Guida di Consenso esistenti affermano:

a. NCCLS<sup>(19)</sup>: nitrato di pilocarpina 2-5g/L in soluzione acquosa all'anodo o 5g/L su dischi di gel. 0,05 mol/L di solfato di magnesio o 0,01M di acido solforico o pilocarpina su dischi di gel al catodo.

Livello di evidenza IV

b. Welsh<sup>(28)</sup>: nitrato di pilocarpina 2-5g/L in soluzione acquosa all'anodo, 0,1 mol/L di solfato di magnesio al catodo, o come per l'anodo. Dischi di gel Wescor come istruzioni del fornitore.

Livello di evidenza IV

**Nitrato di pilocarpina 2-5g/L è la soluzione raccomandata su entrambi gli elettrodi. Soluzioni alternative, come solfato di magnesio, possono essere usate al catodo.**

**Livello globale di evidenza IIb**

La pilocarpina o altre soluzioni di elettroliti, quando usate per iontoforesi, possono essere:

1. forniti dal produttore insieme all'apparecchio, come i dischi di pilogel della Wescor
2. forniti separatamente dall'apparecchio per stimolazione, come nel caso dei tamponi di carta da filtro per raccogliere il sudore. Il costruttore dell'apparecchio per stimolazione esplicitamente dichiara di non fornire le soluzioni di elettroliti.

In Inghilterra, la pilocarpina o altri elettroliti usati con tali sistemi rientrano nella categoria dei prodotti medicinali senza licenza (descritti comunemente come "speciali")(Rif. A). Essi possono essere forniti solo in condizioni molto limitate, da quelle ditte che possiedono la licenza "specials" (Rif. B). I costruttori con licenza "specials" in Inghilterra non possono pubblicizzare prodotti speciali, sebbene essi possono rispondere alla richiesta di informazioni su prodotti specifici. Essi includono un numero di dipartimenti di farmacia ospedaliera classificati come farmacie di produzione così come le compagnie commerciali. Una lista aggiornata dei contatti viene pubblicata regolarmente (Rif. C).

I laboratori di biochimica clinica non hanno i requisiti legali di costruttori con licenza "specials" , e non dovrebbero farsi in casa le soluzioni per iontoforesi.

Livello di evidenza IV

Riferimenti bibliografici

- A. Appelbe GE, Wingfield J. Chapter 2. Medicines Act 1968. The Licensing System. P13-34 in Pharmacy Law and Ethics 1998 (\*6<sup>th</sup> Edition). The Pharmaceutical Press, London.
- B. The supply of unlicensed relevant medicinal products for individual patients. MCA Guidance Note 14. Revised February 2000. Policy Unit. Inspection & Enforcement Division, medicines Control Agency, Market Towers, 1 Nine Elms Lane, london, SW8 5 NQ.
- C. Special-order Manufacturers. British National Formulary latest edition. British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain (e.g. No. 42 September 2001, p 767).

### 3.2.3 Iontoforesi: tempi e tensione elettrica

Il primo riferimento sulla iontoforesi<sup>(34)</sup> specificava 2mA/4,9cm<sup>2</sup> (dopo un lento aumento) per 5 min se si usano supporti di carta da filtro, 15 min se si usano garze. Altri vecchi lavori citavano correnti di 2-5mA fino a 15 min, senza studiare l'effetto della variazione<sup>(21,22,30,31,32,39)</sup>. Il primo sistema di raccolta del sudore della Webster – modello 3500<sup>(24,36)</sup> usava tamponi di garza e suggeriva una corrente di 1,5mA per 5 min, dopo un lento aumento, fornite da generatori settabili da 1 a 5 mA.

Livello di evidenza IIb

Price<sup>(29)</sup> raccolse una quantità di sudore insufficiente con il sistema Orion in 5 min. Egli variò la stimolazione da 5 a 15 min, una volta che la corrente si era stabilizzata nella zona della iontoforesi, senza trovare effetti né sulla quantità di sudore prodotto, né sui valori del cloro.

Livello di evidenza IIb

Webster<sup>(40)</sup> rivide le basi teoriche del calcolo della distribuzione di pilocarpina per cm<sup>2</sup> di superficie cutanea e concluse che il sistema cute + ghiandole + capillari era troppo complesso per questo per essere valido. Egli concluse che le condizioni della cute potevano essere solo stabilite empiricamente. Egli dimostrò che aumentando la durata della iontoforesi da 1 a 3 min con una corrente di 1,5mA, aumentava la velocità di produzione del sudore, comunque un ulteriore aumento della durata della iontoforesi da 3 a 7 min non produceva un aumento della velocità di produzione del sudore. Kirk<sup>(41)</sup> dimostrò che una corrente di 1, 2 o 4 mA non alterava i risultati del sodio o dell'osmolalità.

Livello di evidenza IIb

Webster calcolò che la sudorazione ottimale si ha quando si distribuisce una carica elettrica di 47 mC per cm<sup>2</sup> di superficie cutanea<sup>(40)</sup>. Una corrente più bassa era comunque sufficiente ad indurre un'adeguata sudorazione usando gli elettrodi Wescor più piccoli. Uno studio osservazionale<sup>(38)</sup> delle pratiche in uso in 30 laboratori inglesi negli anni 1998-1999 rivelò l'uso di correnti da 1,5 mA a 4 mA per intervalli di tempo da 4 a 10 min. Solo 2 centri usavano tempi > 5,5 min.

L'intensità della corrente applicata nel sito di stimolazione dipenderà dalle dimensioni dell'area cutanea su cui si applica la corrente. In pratica una corrente di 4 mA viene applicata con elettrodi di varie dimensioni senza alcun rilievo di effetti indesiderati.

Livello di evidenza IV

I manuali di istruzione della Wescor affermano: con l'introduzione dei dischi di Pilogel di pilocarpina<sup>(37)</sup> lo stimolatore modello 3600 della Wescor è stato settato per generare una corrente di 1,7mA per 5 min<sup>(25)</sup>. L'operatore non può intervenire. Il più recente sistema Nanoduct della Wescor<sup>(32)</sup> impiega una corrente di 0,5mA per 2 min non appena la corrente giunge attraverso elettrodi più piccoli e aumenta la concentrazione di pilocarpina di 3 volte nel gel con tampone citrato

Livello di evidenza IV

Le Linee Guida di Consenso esistenti affermano:

- a. NCCLS<sup>(19)</sup>: per raccolte di sudore su carta da filtro l'NCCLS raccomanda di iniziare con una corrente di 0,5 mA e gradualmente arrivare a 4 mA e mantenerla a 4 mA per 5 min. La corrente viene diminuita gradualmente. Per i tubi di raccolta Microbore (Wescor) seguire le istruzioni del costruttore.
- b. Welsh<sup>(28)</sup>: la corrente dovrebbe essere aumentata gradualmente fino ad un massimo di 4 mA e controllata manualmente attraverso un controllo in uscita per 5 min. La corrente viene diminuita lentamente. Gli apparecchi Wescor sono programmati a 1,5 mA per 5 min, poi la corrente diminuisce lentamente.

Livello di evidenza IV

**Per ottenere un'adeguata stimolazione del sudore, la iontoforesi dovrebbe essere protratta per almeno 3 min e per non più di 5 min. La corrente non dovrebbe superare i 4 mA.**

Livello globale di evidenza IIb

3.2.4 Sicurezza:

1. Il lavoro definitivo di Schwarz<sup>(22)</sup> esaminava i rischi in dettaglio. Una corrente di 50mA fatta passare da un arto anteriore all'altro in un coniglio determinava arresto respiratorio attraverso uno spasmo muscolare tetanico. L'applicazione di una corrente di 1,5 mA per cm<sup>2</sup> di cute della superficie volare dell'avambraccio di un adulto sano (molto maggiore rispetto a 0,07 mA applicati nel test standard) non causa bolle o bruciature<sup>(22)</sup>, purchè ci sia abbastanza elettrolita. Schwarz eseguì una serie di esperimenti per verificare quali fattori predisponessero a bolle e bruciature cutanee. Egli mostrò che l'iniezione di atropina produceva un'area gonfia, edematosa e diminuiva la resistenza cutanea da 40 a 100 volte. La iontoforesi a 4mA per 5 min per introdurre atropina nella cute determinava dolore, piccole ulcere o rigonfiamento edematoso. La resistenza cutanea nelle aree con bolle era ulteriormente ridotta. Egli notò che la eseguendo la iontoforesi a corrente costante è possibile osservare una riduzione marcata della resistenza cutanea, non appena si formano le bolle. Le seguenti misure aumentavano il rischio di complicazioni:

- gli elettrodi fissati saldamente producevano bolle peggiori, rispetto agli elettrodi fissati più allentati, in grado di muoversi per eguagliare il flusso di corrente
- con l'acido cloridrico non tamponato a concentrazioni < 0,01 mmol/L, più basso era il pH e peggiori erano le bolle. Con il cloruro di potassio si formavano bolle se si usavano meno di 12 fogli di carta da filtro. Le bolle si formavano durante la iontoforesi quando il pH della cute era < 2,6. tampone citrato 0,1N e glicina/HCl causavano bolle quando il pH del tampone iniziale era < ~2,0. 0,9% di cloruro di sodio e 1,2% di nitrato di sodio generavano pH di 3,4 e 3,2 vicino all'elettrodo. Usando nitrato di pilocarpina 4,5g/L e 12 fogli di carta da filtro, il pH dei fogli vicini alla cute era 5,9 e di quelli più vicini all'elettrodo era 4,2 dopo 5 min con corrente a 4mA.
- Meno fogli di carta da filtro generano più bolle
- Fogli di carta da filtro più asciutti generano più bolle

Livello di evidenza IIb

Il lavoro originale sulla iontoforesi<sup>(34)</sup> riferisce di bruciature che avvengono molto raramente, dovute al contatto dell'elettrodo con la cute. I dati su 7200 tests eseguiti da un

unico tecnico esperto<sup>(31)</sup> indicano che si verificano bruciature superficiali al catodo con una frequenza < 1/200 tests.

Livello di evidenza IV

2. Studi sugli effetti collaterali sono tutti su piccoli numeri.

- a. Un report aneddotico<sup>(42)</sup> riporta una bruciatura durante un test eseguito da un operatore non esperto che non aveva seguito il paziente durante la iontoforesi.
- b. Rattenbury<sup>(43)</sup> riportò 2 casi di bruciature durante test eseguiti da tecnici esperti: in 1 caso gli elettrodi modificati erano stati applicati senza applicare i dischi di gel di pilocarpina; nel 2° caso il bambino aveva l'eczema, sebbene non nel sito del test. La bruciatura era stata attribuita al contatto dell'elettrodo con la cute. Un questionario restituito da 6 su 10 laboratori di pediatria evidenziava che tutti qualche volta hanno visto una bruciatura. L'arrossamento della cute veniva visto di frequente (normale reazione alla iontoforesi con pilocarpina). Le bolle erano associate con bruciature da acido dovute ai tamponi che erano inumiditi in modo inadeguato o all'irregolare superficie degli elettrodi; bruciature decisamente elettriche erano dovute al contatto diretto dell'elettrodo con la cute.

Livello di evidenza IV

- c. 2 incidenti<sup>(44)</sup>, ascritti all'uso di elettrodi deformati, corrosi o non adeguatamente mantenuti, furono riferiti all'MDA e portarono ad un avviso di rischio per la sicurezza. Si raccomanda quindi di usare dei tamponi che siano leggermente più larghi degli elettrodi per minimizzare il rischio di contatto dell'elettrodo con la cute. Non furono segnalati incidenti allo Scottish Incident Reporting & Investigation Centre<sup>(45)</sup>.

Livello di evidenza IV

- d. Le verifiche in Inghilterra<sup>(38)</sup> rivelarono che 21 centri su 30 avevano osservato arrossamento della cute e orticaria, mentre 7 centri avevano osservato bolle o bruciature. Le verifiche regionali che impiegavano gli stessi o questionari simili mostrarono una variabilità sul fatto che le bruciature venissero o no riferite<sup>(46,47)</sup>.

Livello di evidenza IV

- e. Un vecchio documento di consenso<sup>(21)</sup> raccomandava che i tamponi fossero delle stesse dimensioni degli elettrodi, poiché tamponi più larghi degli elettrodi determinavano una intensità di corrente più elevata immediatamente sotto gli elettrodi, specialmente se fissati strettamente. Gli elettrodi del sistema Wescor 3600 sono rientrati<sup>(25,37)</sup>, riducendo il rischio che il bordo dell'elettrodo tocchi la cute. Questo vantaggio si perde se i dischi di gel vengono usati con elettrodi non Wescor. L'uso di dischi di gel dello spessore di 6mm garantisce inoltre una densità di corrente uniforme e lo spessore riduce la penetrazione di acido dall'elettrodo alla cute.

Livello di evidenza IV

Le Linee Guida di Consenso esistenti affermano:

a. NCCLS<sup>(19)</sup>: riquadri di garza o carta da filtro poco più larghi degli elettrodi (Es: elettrodi di dimensioni 3.8x3.8cm dovrebbero usare tamponi do dimensioni 5.1x5.1cm), ma più piccoli dell'estremità del paziente.

Livello di evidenza IV

b. Welsh<sup>(28)</sup>: Hospital Lint (BPC Plain 500gr di spessore 4-8), o 10-15 foglietti di carta da filtro Whatman 42/44)

Livello di evidenza IV

**Un rischio teorico di fibrillazione atriale non è mai stato documentato. Vengono sporadicamente riportate bruciature o bolle dovute al contatto diretto dell'elettrodo sulla cute, o all'uso di tamponi per elettroliti inadeguati tra cute ed elettrodo.**

Livello globale di evidenza IV

**Il rischio può essere minimizzato usando tamponi di garza ben saturati, di adeguate dimensioni e spessore e tenendo sotto osservazione il paziente per segni di distress o disturbi da elettrodi o da tamponi durante tutto il periodo della iontoforesi.**

Livello globale di evidenza IIb

### 3.3 Mezzo di raccolta – tempi

Il sudore deve essere raccolto in quantità sufficiente per consentire un'analisi precisa ed accurata. Durante la raccolta deve essere protetto da contaminazione ed evaporazione. Al termine della raccolta tutto il sudore prodotto, incluso il condensato formatosi sul rivestimento impermeabile, deve essere trasferito sulla carta da filtro per l'analisi: vedi SOP di esempio (Appendice 2a e 2b) per dettagli.

Livello di evidenza IV

#### 3.3.1 Mezzo di raccolta

1. Gibson e Cooke<sup>(34)</sup> hanno descritto raccolte di sudore su dischi di carta da filtro di 2,5cm di diametro o su garze quadrate di dimensioni 3x3 pollici. Il solo vantaggio di usare quadrati di garza più larghi con tempi di raccolta più lunghi era solo per aumentare il volume di sudore raccolto, necessario per la sensibilità dei vecchi metodi di analisi del cloro.

Livello di evidenza IV

2. Dubbi circa la possibile contaminazione con sodio e cloro ha portato alcuni autori a lavare ed asciugare garze o carte da filtro prima dell'uso<sup>(39)</sup>.

Livello di evidenza IV

3. Diversi autori si sono cimentati con sistemi di raccolta del sudore che consentivano di stoccare sudore liquido in aliquote sequenziali. L'identificazione di problemi legati alla condensazione del sudore in provette fredde<sup>(48)</sup> ha portato Webster a sviluppare per primo

il sistema di raccolta con coppette riscaldate<sup>(36)</sup>, poi il sistema Macroduct<sup>(37)</sup>, infine il sistema che accoppia raccolta e misura conduttivimetrica<sup>(32)</sup>.

Livello di evidenza IV

4. I dischi di carta da filtro vengono ricoperti con un foglietto di materiale impermeabile e fissate nel sito di raccolta con nastro adesivo. Materiali idonei sono: politene, parafilm e seta oleata.

Livello di evidenza IV

5. Le Linee Guida di Consenso esistenti affermano:

- a. **NCCLS**<sup>(19)</sup>: raccomanda l'uso di riquadri di garza o carta da filtro. Queste devono essere a basso contenuto di sodio e cloro. Se si usa carta da filtro, questa dovrebbe avere una capacità di assorbimento tale da trattenere tutto il sudore stimolato. Usare garze o carta da filtro delle stesse dimensioni per stimolazione e raccolta. Alternativamente il sudore può essere raccolto in capillari.

Livello di evidenza IV

- b. **Welsh**<sup>(28)</sup>: raccomanda l'uso di carta prepesata tipo Whatman N°42-44, o alternativamente, il capillare della Wescor.

Livello di evidenza IV

**Il sudore dovrebbe essere raccolto su carta da filtro a basso contenuto di sodio di dimensioni quanto più possibile identiche a quelle dell'area cutanea stimolata (cioè i tamponi di garza usati nella iontoforesi), o su collettori Wescor. La carta da filtro deve essere fissata in posizione con materiale impermeabile, quale politene o parafilm e nastro adesivo resistente all'acqua. Assicurarsi che l'area sigillata resti intatta durante tutta la stimolazione.**

Livello globale di evidenza IV

### 3.3.2 Tempo di raccolta

Ci sono molti dati sperimentali sull'effetto della durata della raccolta del sudore sia sulla quantità di sudore raccolto, sia sulla concentrazione dello stesso.

1. l'elettrodo Orion è stato realizzato con lo scopo di misurare la conduttività del sudore non appena appare sulla superficie cutanea. Price<sup>(29)</sup> ha dimostrato che questo metodo fornisce dati errati a causa della insufficiente quantità di sudore secreto ed ha modificato il sistema, raccogliendo il sudore in una coppa per 10 min prima della misurazione in situ.

Livello di evidenza IIb

2. Sono stati sviluppati diversi sistemi di raccolta del sudore: raccolta in 5 min su diverse carte da filtro<sup>(31)</sup>; raccolte con sistemi Macroduct<sup>(49)</sup> o altri capillari<sup>(50)</sup> e successivo sezionamento del capillare o misure di conduttività in continuo<sup>(32)</sup>. Tutti gli autori hanno concluso che la secrezione di sudore dopo stimolazione inizia lentamente, poi aumenta e, una volta stabilizzata (dopo circa 2 min), decresce in modo continuo col passare del tempo.

Livello di evidenza IIb

3. Spesso, usando misure di osmolalità o conduttività per raccolte di sudore differenziali, è stato anche mostrato che la concentrazione del sudore diminuiva in tandem con la velocità di secrezione del sudore<sup>(29,32,36,49,50,51)</sup>. Price<sup>(29)</sup> trovò che la concentrazione di Cl<sup>-</sup> raggiungeva un plateau dopo 10 min dal termine della iontoforesi, per poi cadere in modo continuo. Kirk<sup>(41)</sup> ha trovato che, tra i vari intervalli di tempo che si potevano usare in pratica per la raccolta del sudore, non c'era differenza significativa nei valori di osmolalità e concentrazione di sodio di due adulti volontari in cui il sudore è stato raccolto in diverse sedute con intervalli di raccolta di 10, 20 e 40 minuti.

Livello di evidenza IIb

4. Hjelm considerò che a quantità di sudore più basse (tempo di raccolta oltre i 30 min) corrispondevano concentrazioni di sodio più alte e usò un grafico (peso del sudore vs concentrazione di sodio) per agevolare l'interpretazione dei dati<sup>(52)</sup>.

Livello di evidenza III

5. Diminuire il tempo di raccolta del sudore da 60 min a 30 min, portò a una diminuzione della quantità media di sudore raccolto statisticamente non significativa (da 520 mg a 490 mg)<sup>(20)</sup>. Estendere i tempi di raccolta del sudore oltre i 30 min apporta un minimo, o addirittura nessun guadagno nel rapporto peso/volume.

Livello di evidenza III

6. Le Linee Guida di Consenso esistenti affermano:

a. **NCCLS**<sup>(19)</sup>: il tempo di raccolta del sudore è generalmente di 30 min. Estendere il tempo di raccolta oltre i 30 min può comportare un campionamento errato, in quanto generato da un numero di ghiandole sudoripare stimulate inferiore al numero massimale, con il rischio di falsi negativi.

b. **Welsh**<sup>(28)</sup>: il sudore dovrebbe essere raccolto a temperatura ambiente per 30 min.

Livello di evidenza IV

**La secrezione di sudore è bassa subito dopo la iontoforesi, aumenta fino ad un massimo tra 10 e 30 min, poi diminuisce rapidamente. Il sudore dovrebbe essere raccolto per non meno di 20 min e non più di 30 min. Le misurazioni in situ (elettrodo Orion) non dovrebbero essere usate**<sup>(53)</sup>.

Livello globale di evidenza IIb

**Appendice: disponibilità di strumenti in sostituzione in Inghilterra:**

Il generatore EMS molto diffuso non viene più fabbricato, sebbene la ditta ancora faccia assistenza per le unità esistenti. L'unico fornitore identificato di un generatore tipo "Gibson-Cooke" alimentato a batteria e con limitazione di corrente è la C&S Electronics Inc, 2565 16<sup>th</sup> Ave, Columbus, NE 68601<sup>(54)</sup>. Questo è ampiamente usato in USA.

I Sistemi Wescor in Inghilterra vengono forniti da Chemlab Scientific Products, Hornchurch, Essex.

#### 4. Analisi del sudore

##### 4.1 Aspetti preanalitici

###### 4.1.1 Conservazione prima dell'analisi

L'evaporazione del sudore durante la raccolta, il trasferimento e il trasporto costituisce una potenziale fonte di errore nel test del sudore<sup>(19)</sup>.

Il sudore liquido può essere raccolto in tubi capillari di vetro della capacità di 100 uL sigillati con plastilina, lasciando un vuoto d'aria tra plastilina e sudore, fino a 6 ore<sup>(55)</sup>.

**Livello di evidenza IIb**

LeGrys<sup>(56)</sup> non ha riscontrato nessuna variazione nella concentrazione di cloro nel sudore raccolto su garza e conservato a 4°C in contenitori a chiusura ermetica fino a 3 gg dalla raccolta, con o senza diluente.

**Livello di evidenza IIb**

I tubi capillari Macroduct non sono completamente impermeabili. L'evaporazione era evidente entro 48 ore nei campioni conservati a temperatura ambiente, ma non c'erano variazioni nelle misure di conduttività effettuate su soluzioni di cloruro di sodio conservate nei capillari riscaldati Macroduct sigillati a 4°C fino a 72 ore<sup>(57)</sup>.

**Livello di evidenza IIb**

**Il sudore può essere raccolto in sedi lontane e trasportate in laboratorio per l'analisi, facendo attenzione alle condizioni di conservazione durante il trasporto.**

**Livello globale di evidenza IIb**

###### **4.1.2 Pesare i campioni di sudore**

Allo scopo di pesare con la maggiore accuratezza possibile il sudore raccolto è necessario usare una bilancia analitica con sensibilità pari a 0,0001gr, come raccomandato dalle NCCLS<sup>(19)</sup>.

Usare la stessa bilancia per pesare contenitore e carta da filtro, prima e dopo la raccolta del sudore. La seconda pesata dovrebbe essere eseguita il prima possibile dopo la raccolta del sudore.

**Livello di evidenza IV**

###### 4.1.3 Definizione di campione idoneo

Il metodo originale di Gibson e Cooke<sup>(34)</sup> descrive una velocità media di sudorazione pari a 5,17gr/m<sup>2</sup>/min con un intervallo tra 1,22 e 9,18 in 55 soggetti testati. Molti autori hanno

mostrato che la concentrazione del sudore varia al variare della velocità di secrezione del sudore<sup>(29,32,49,51,52,58)</sup>.

Livello di evidenza IIb

I primi lavori<sup>(58)</sup> stabilirono che questo non causava problemi nell'interpretazione del test, poiché era limitato dal volume minimo di sudore richiesto per l'analisi.

Livello di evidenza IV

Non appena i volumi di analisi diminuirono, fu proposta una velocità media di sudorazione pari ad almeno  $1\text{gr}/\text{m}^2/\text{min}$  oltre il periodo di raccolta<sup>(19)</sup>. Questo parametro viene raggiunto dalla grande maggioranza dei soggetti<sup>(12)</sup>.

Livello di evidenza IV

Hjelm<sup>(52)</sup> mostrò che esiste una correlazione inversa tra peso del sudore e concentrazione di sodio per i bambini normali e i bambini CF. Egli usò un grafico (sodio vs peso del sudore) per separare nettamente le due popolazioni, ma non riportò i dati sulle misure del cloro.

Livello di evidenza III

I dati raccolti dal sottogruppo di laboratorio inglese ha mostrato alcune evidenze di un aumento nei risultati di cloro intermedi quando venivano analizzati campioni con velocità di sudorazione inferiore a  $1\text{gr}/\text{m}^2/\text{min}$ , sebbene ci fossero variazioni da centro a centro<sup>(12)</sup>. Sebbene il dato sia relativamente arbitrario, i campioni con velocità di sudorazione inferiore a  $1\text{gr}/\text{m}^2/\text{min}$  indicano o che si è verificata una sudorazione subottimale, o che una significativa quantità di sudore prodotto è stata persa per perdita di campione o per evaporazione. Fare un pool di diverse raccolte di sudore aumenta la quantità di sudore disponibile per l'analisi, e potrebbe influenzare il risultato, ma non incide su nessuno dei fattori che hanno portato ai campioni con scarsa resa.

Livello di evidenza III

**Ogni centro dovrebbe calcolarsi un valore minimo peso/volume di sudore raccolto che sia equivalente ad una velocità di sudorazione media, durante il tempo di raccolta, pari a  $1\text{gr}/\text{m}^2/\text{min}$ . Questo valore dovrebbe essere riportato sul referto del test. Campioni con un rapporto peso/volume inferiore a quello fissato non dovrebbero essere analizzati. Non si dovrebbe fare un pool dei campioni insufficienti. In questi casi, si dovrebbe ripetere l'intero test del sudore.**

Livello globale di evidenza III

Appendice:-

Calcolo della velocità media di sudorazione nel tempo di raccolta.

La velocità media di produzione del sudore nell'area di raccolta è misurata in  $\text{gr}/\text{m}^2/\text{min}$  per verificare se la produzione di sudore è stata adeguata. L'area di raccolta del sudore equivale all'area coperta dal sistema di raccolta del sudore, cioè la carta da filtro o il collettore Macroduct). Quest'area dovrebbe essere approssimativamente uguale all'area in

cui la pilocarpina è stata distribuita alle ghiandole sudoripare tramite iontoforesi, cioè l'area coperta dai tamponi impregnati di pilocarpina o dai dischi di pilogel.

Calcolare l'area di raccolta in  $\text{cm}^2$ , come  $\pi r^2$ , dove  $r$  è il raggio della carta da filtro usata per la raccolta del sudore.

I dischi di pilogel e l'area di raccolta del sudore con il sistema Macroduct hanno un diametro di 2.8cm.

La velocità media di sudorazione nel periodo di raccolta espressa in  $\text{gr/m}^2/\text{min}$  si ricava dalla seguente formula:

$$\frac{10000}{\text{area}(\text{cm}^2)} \times \frac{\text{peso (mg o uL)}}{1000} \times \frac{1}{\text{tempo di raccolta (min)}}$$

$$= \frac{10}{\text{area (cm}^2)} \times \frac{\text{peso (mg o uL)}}{\text{tempo di raccolta (min)}}$$

Localmente ogni centro dovrebbe usare un valore minimo di sudore in peso o volume, equivalente ad una velocità media di sudorazione pari a  $1\text{gr/m}^2/\text{min}$ . Ad esempio, una raccolta di 30 min su un disco di carta da filtro con diametro di 5,5cm ad una velocità di  $1\text{gr/m}^2/\text{min}$  deve fornire una quantità di sudore di 71mg o uL. Con un sistema Macroduct la quantità di sudore prodotta alla velocità di  $1\text{gr/m}^2/\text{min}$  in 20 min corrisponde ad una quantità di sudore di 12uL, e in 30 min a 18uL. La raccomandazione del fornitore che indica 15uL come la quantità di sudore minima consentita, sembra corrispondere alla media tra 18 e 12. Questo enfatizza l'importanza del tempo di raccolta nell'interpretare la velocità minima accettabile e l'inutilità di protrarre il periodo di raccolta nel tentativo di incrementare la resa.

#### 4.2 Eluizione del sudore dalla carta da filtro

Ci sono molto poche evidenze su cui basare la migliore pratica. Se i laboratori che raccolgono il sudore su carta da filtro trattano il CQI in maniera appropriata (cioè applicano il materiale di controllo sulla carta da filtro), i risultati sul CQI daranno evidenza di una soddisfacente eluizione. Le linee guida NCCLS<sup>(19)</sup> raccomandano, per l'eluizione del sudore dalla carta da filtro, 40 min senza agitazione (per evitare che si stacchino fibre dalla carta da filtro che potrebbero interferire con l'analisi). Siamo sicuri che molti laboratori impieghino con successo dei miscelatori. Nell'audit sulle pratiche di laboratorio nella Regione del Trent<sup>(46)</sup>, è risultato che la maggior parte dei laboratori eseguiva l'eluizione del campione in 30 min.

Livello di evidenza IV

### 4.3 Analita(i)

#### 4.3.1 Cloro

Il cloro su sudore è l'analita più direttamente correlato alla funzione anormale del CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), il canale del cloro difettivo nei pazienti FC<sup>(59,60,61)</sup>.

Quando si confrontano i costituenti del sudore nella popolazione normale e nei pazienti FC il contenuto di cloro è di gran lunga il principale discriminante tra le due popolazioni rispetto all'osmolalità e al contenuto di sodio<sup>(62,63,64,65,66)</sup>.

Livello di evidenza IIb

Il cloro è raccomandato quale analita di prima scelta dalle linee guida NCCLS<sup>(19)</sup> e lo Standard Welsh<sup>(28)</sup>.

Livello di evidenza IV

#### 4.3.2 Sodio

Il sodio nel sudore non discrimina così bene come il cloro tra popolazione FC e popolazione normale<sup>(62,63,64,65,66)</sup>. Il valore del rapporto sodio/cloro come test discriminante non è ancora chiaro (vd. sezione 6.4). Alcuni laboratori misurano il sodio in aggiunta al cloro quale procedura di assicurazione di qualità (vd. sezione 5.3.1).

Livello di evidenza IIb

#### 4.3.3 Potassio

Il potassio viene analizzato molto raramente nel sudore e discrimina molto poco tra popolazione con e senza FC<sup>(66)</sup>.

Livello di evidenza IIb

#### 4.3.4 Conduttività

Nei pazienti FC anche altri componenti del sudore, soprattutto sodio e potassio, sono aumentati oltre al cloro, in quanto sono misure della concentrazione totale di ioni (conduttività e osmolalità). Poiché le misure di conduttività riflettono la concentrazione di cloro, più tutti gli altri ioni presenti nel sudore, quali il sodio che è meno in relazione, o per niente affatto, con la funzione del CFTR, ci si potrebbe aspettare che queste misure non siano altrettanto efficaci nel discriminare tra soggetti sani e affetti da FC.

I dati dalle UK NEQAS Sweat Testing Surveys<sup>(67)</sup> evidenziano un CV tra laboratori più contenuto per le misure di conduttività rispetto alle misure di sodio e cloro (vd. sezione 5.4).

Livello di evidenza III

La US Cystic Fibrosis Foundation avvisa che non è appropriato eseguire il test del sudore usando misure conduttivimetriche<sup>(68)</sup>. Le linee guida NCCLS<sup>(19)</sup> accettano le misure conduttivimetriche solo come "test di screening", così come lo Standard Welsh<sup>(28)</sup>. Il ruolo di un test di screening è discutibile.

Livello di evidenza IV

Sono stati pubblicati 2 studi<sup>(69,70)</sup> su larga scala che confrontavano i risultati del dosaggio del cloro su sudore con misure conduttivimetriche che hanno mostrato un eccellente potere discriminante tra popolazione normale ed FC. Uno studio recente su 118 pazienti FC e 200 controlli ha dimostrato nessuna mancata diagnosi usando la sola conduttività,

ma 7 risultati intermedi con la conduttività che erano normali o anormali con il dosaggio del cloro<sup>(71)</sup>.

Livello di evidenza IIb

Comunque, poiché le misure di conduttività sono usate raramente nei centri di riferimento o nei centri di terzo livello dove si dosa sempre il cloro su sudore, non si possono fare studi comparativi su misure conduttivimetriche su adulti e pazienti con valori di cloro intermedi che potrebbero avere una forma atipica di FC. E' necessario raccogliere altri dati oltre alle misure di cloro su sudore prima di elaborare raccomandazioni sull'interpretazione di misure conduttivimetriche in questi gruppi di pazienti. Questa evidenza è necessaria per risolvere l'attuale controversia in letteratura sui relativi meriti della misura del cloro e delle misure conduttivimetriche<sup>(70,72,73,74)</sup>.

**Resta da dimostrare se l'aumentata performance analitica delle misure conduttivimetriche sul dosaggio del cloro può avere maggior peso dei teorici svantaggi legati alla sua misura.**

Livello globale di evidenza IIb

#### 4.3.5 Osmolalità

L'osmolalità è la misura della concentrazione totale di soluti nel sudore, incluse le molecole neutre. Quindi, ci si può aspettare una minore efficacia di questa misura nel discriminare tra popolazione FC e non FC rispetto al dosaggio del cloro o alle misure conduttivimetriche.

L'osmolalità correla bene con la misura del sodio nel sudore<sup>(55)</sup>. Ha un basso potere discriminante rispetto al dosaggio del cloro nel distinguere tra soggetti FC e non FC con valori di sodio analoghi<sup>(70)</sup>.

Livello di evidenza IIb

In un centro l'osmolalità viene misurata in aggiunta al sodio. Dopo l'introduzione del dosaggio del cloro, l'osmolalità non forniva informazioni ulteriori, né discriminava meglio del dosaggio del sodio in aggiunta al dosaggio del cloro. E' stato abbandonato in favore del dosaggio del cloro<sup>(55)</sup>.

Livello di evidenza IIb

In Inghilterra l'osmolalità è stata largamente soppiantata dalla conduttività; come conseguenza c'è una perdita di dati disponibili dalla UK NEQAS Sweat Testing Surveys<sup>(67)</sup>.

Livello di evidenza IIb

#### 4.4 Metodologia

Queste linee guida non forniscono raccomandazioni su quale metodo(i) usare.

##### 4.4.1 Cloro

I seguenti metodi per il dosaggio del cloro nel sudore sono ampiamente usati in Inghilterra:

- a. Colorimetria<sup>(65,75)</sup>
- b. Coulometria<sup>(76)</sup>

a. ISE indiretto<sup>(77,78)</sup>

b. ISE diretto: un piccolo numero di laboratori riferisce alla UK NEQAS<sup>(67)</sup> di impiegare una serie di metodi che vengono classificati come ISE diretto. Ci sono dati insufficienti per verificare la performance di queste metodi.

Le linee guida **NCCLS**<sup>(19)</sup> raccomandano la coulometria e cautela nell'impiego dei moduli ISE impiegati per dosaggi su siero.

Livello di evidenza IV

Sostituire o mantenere un analizzatore per il cloro o un fotometro a fiamma solo per dosaggi su sudore può non essere possibile. Non c'è una ragione scientifica per cui gli spettrofotometri da laboratorio standard o i moduli ISE non vengano usati per l'analisi del sudore, purché si impieghino standard appropriati e materiali per il controllo di qualità interno e la metodica sia validata per la specifica apparecchiatura in uso.

Garantita la validità analitica della metodica in un ampio range della concentrazione di cloro (0-150 mEq/L), incluso l'uso di appropriate procedure di CQI, non sembra esserci alcuna ragione teorica perché i moduli ISE non possano essere impiegati per l'analisi del sudore: una matrice biologica più semplice del siero e meno variabile delle urine.

Il gruppo più consistente di laboratori che partecipa alla UK NEQAS<sup>(67)</sup> usa la colorimetria, la coulometria e i moduli ISE, con CV di circa il 10% per concentrazioni di cloro di 40 mmol/L. Schemi di VEQ locali<sup>(57)</sup> hanno mostrato che tutti questi metodi hanno livelli di performance soddisfacenti. Per il metodo colorimetrico si ha<sup>(70)</sup> un CV del 2.5% tra batch per concentrazioni di cloro di 50 mmol/L (vd. anche sezione 5.3.1).

Livello di evidenza III

La misura del cloro in situ nell'area cutanea stimolata con elettrodo Orion (ISE diretto) si è dimostrata molto meno affidabile della misura del cloro nel sudore raccolto in 30 minuti, e non dovrebbe essere usata<sup>(29,53)</sup>.

Livello di evidenza IIb

#### 4.4.2 Sodio

Le UK NEQAS Sweat Testing Surveys riferiscono sia della fotometria a fiamma<sup>(79)</sup> che dell'ISE indiretto<sup>(77,78)</sup>. Tutti i metodi hanno performance simili nella UK NEQAS<sup>(67)</sup> con un CV che si aggira intorno al 10% per concentrazioni di sodio di 40 mmol/L (vd. anche sezione 5.3.1).

Livello di evidenza III

#### 4.4.3 Conduttività

La metodica di misura della conduttività nel sudore in Inghilterra è limitata agli utilizzatori delle apparecchiature Wescor che raggiungono un CV <5% per tutte le concentrazioni di elettroliti circolate nelle UK NEQAS Sweat Testing Surveys<sup>(67)</sup>.

Livello di evidenza III

## 4.5 Referto

### 4.5.1 Modello di referto

Un modello di referto è dettagliato nelle Welsh Consensus Guidelines<sup>(28)</sup> che costituiscono le basi delle raccomandazioni per la stesura del referto.

Livello di evidenza IV

## 5. Qualità

### Evidenza

Esistono report pubblicati<sup>(80,81,82,83,84)</sup> e comunicazioni personali che riferiscono l'esperienza clinica della scarsa performance del test del sudore che porta ad una errata diagnosi. I falsi negativi destano una particolare preoccupazione a causa del potenziale ritardo nella diagnosi<sup>(85)</sup>. C'è preoccupazione circa la competenza dell'operatore che esegue la raccolta, la necessità di un controllo di qualità interno e di una verifica esterna di qualità per verificare la performance del metodo, la competenza dell'analista e l'interpretazione dei dati.

Risultati falsi positivi o falsi negativi possono verificarsi per una o più delle seguenti ragioni:

- fisiologia del paziente
- raccolta inadeguata del sudore
- metodologia di scarsa qualità/inaffidabile
- scarsa manualità dell'operatore
- errata interpretazione

Questa sezione parla della performance della raccolta del sudore, dei metodi di dosaggio del cloro e sodio e delle misure di conduttivimetriche.

### 5.1 Contaminazione del sudore

Se il sudore raccolto è stato soggetto a contaminazione o evaporazione non dovrebbe essere analizzato. Un'indicazione potrebbe essere una quantità di sudore insufficiente misurata come velocità media di secrezione del sudore  $< 1 \text{ gr/m}^2/\text{min}$  (vd. sezione 4.1.3). Qualunque altro campione in cui l'operatore rilevi o sospetti fortemente problemi di contaminazione o di evaporazione (Es: sigillo rotto durante la raccolta del sudore o carta da filtro caduta a terra) non dovrebbe essere analizzato.

Livello di evidenza IV

### 5.2 Metodi analitici

Dovrebbero essere usati metodi appropriati (vd. sezione 4.4) che consentono di misurare gli analiti in intervalli di concentrazione validi sia per soggetti normali che per soggetti con FC (cioè per cloro e sodio il range analitico dovrebbe essere compreso tra 0 e 150 mmol/L). Si dovrebbe accertare il limite inferiore di rilevazione del metodo che in ogni caso non dovrebbe essere superiore a 10 mmol/L. Gli standards CPA e le linee guida stabiliscono che la performance di ogni test sia ampiamente documentata sotto forma di SOP (Standard Operating Procedure)<sup>(27)</sup>. La SOP dovrebbe includere il metodo(i) analitico(i), le procedure di qualità, la refertazione, l'interpretazione dei dati e tutti gli aspetti relativi alla sicurezza.

Livello di evidenza IV

### 5.3 Controllo di Qualità Interno (CQI)

Gli standards Welsh raccomandano un materiale per il controllo di qualità interno (cloruro di sodio 60-70 mmol/L) con un criterio di accettazione =  $\pm 2$  mmol/L<sup>(28)</sup>.

Livello di evidenza IV

Le linee guida NCCLS<sup>(19)</sup> raccomandano l'uso di una soluzione acquosa di elettroliti (Es: cloruro di sodio e/o potassio) di composizione nota che viene depositata su carta da filtro o garza prepesata e quindi processata in parallelo con i campioni ignoti. Quando si analizzano i campioni raccolti su carta da filtro o garza non è sufficiente eseguire l'analisi diretta del materiale di controllo. Se si usa il sudore non diluito (cioè il sistema Wescor) allora è accettabile analizzare direttamente i materiali di controllo. L'NCCLS raccomanda che vengano analizzati contemporaneamente due livelli di controllo ('basso' e 'alto') insieme a ciascun campione o in un batch di campioni. Queste soluzioni dovrebbero essere differenti dai calibratori. I limiti di accettabilità dei risultati per ogni analita dovrebbero essere fissati per ogni materiale di controllo. L'imprecisione può aumentare nel caso di pesi più piccoli e concentrazioni basse.

Livello di evidenza IV

Un audit nella Regione Trent<sup>(46)</sup> mostrò che solo il 50% dei laboratori usava materiali di controllo a concentrazioni clinicamente significative. Solo 3 laboratori su 15 dettagliavano nella loro procedura di CQI come depositare il materiale di controllo sulla carta da filtro. Il 50% dei laboratori aveva un CV del 5% o meno per sodio e cloro. Un audit nella Regione Sud-Ovest<sup>(47)</sup> evidenziò una variabilità nella tipologia di materiali di controllo in uso; molti dei materiali di controllo disponibili in commercio sono applicabili a risultati elevati, ma non a valori normali. Un audit in Inghilterra che includeva Centri Pediatrici di 3° livello e Ospedali di Distretto rilevò una grande variabilità nella standardizzazione e nel CQI<sup>(10)</sup>. I materiali di controllo dovrebbero avere concentrazioni clinicamente importanti e differire dagli standard.

Livello di evidenza III

Gli Standards CPA e le linee guida stabiliscono che le analisi quantitative richiedono livelli multipli di CQI<sup>(27)</sup>.

Livello di evidenza IV

#### 5.3.1 Cloro e Sodio

I dati pubblicati sulla precisione delle analisi di sodio e cloro nel sudore dimostrano un CV compreso tra 3 e 10%. Un CV tra batch compreso tra 3.2 e 3.4 per concentrazioni di cloro di 70 mmol/L si ebbero con analisi colorimetriche manuali su campioni raccolti rispettivamente con metodo Gibson e Cooke e con sistema Wescor<sup>(86)</sup>. Per concentrazioni di sodio di 60 mmol/L (fotometro a fiamma) e raccolta con sistema Wescor il CV variò tra 1.2 e 2.1<sup>(86)</sup>. Usando il metodo dell'elettrodo iono-selettivo si ebbero CV di 11, 8 e 4 a concentrazioni di sodio e cloro rispettivamente di 30, 60 e 120 mmol/L<sup>(87)</sup>. Usando un metodo enzimatico si ebbero CV tra batch di 7.1, 6.1 e 6.0% a concentrazioni di cloro rispettivamente di 10, 20 e 50 mmol/L<sup>(88)</sup>. Heeley<sup>(70)</sup>, usando un metodo colorimetrico per il cloro ottenne un CV di 2.5% per concentrazioni di cloro di 50 mmol/L e, usando il fotometro a fiamma per il sodio, ottenne un CV di 4.3% per concentrazioni di sodio di 53

mmol/L. Sono stati riportati<sup>(63)</sup> CV tra batch per materiali di controllo di 2.4% per il sodio (51 mmol/L), usando il fotometro a fiamma, e di 3.4% per il cloro (100 mmol/L), usando la coulometria.

Livello di evidenza III

#### 5.3.2 Conduttività

Hammond<sup>(69)</sup> riporta CV tra batch di 1.0% per equivalenti di NaCl a concentrazioni di 67 mmol/L.

Livello di evidenza III

**Tutti i metodi analitici dovrebbero avere dei criteri di verifica della precisione almeno a due differenti concentrazioni. Materiali, diversi dai calibratori, a concentrazioni clinicamente significative dovrebbero essere trattati nella stessa identica maniera dei campioni ottenuti dai pazienti.**

Livello globale di evidenza IV

**Sulla base dell'attuale performance dei metodi analitici il CV tra batch dovrebbe essere del 5% (o meno) a concentrazioni di 40-50 mmol/L.**

Livello globale di evidenza III

#### 5.4 Verifica Esterna di Qualità (VEQ)

La verifica esterna di qualità è essenziale per:

- identificare errori di pesatura
- identificare metodi analitici con scarsa performance, inclusi problemi di standardizzazione
- identificare errori di calcolo
- identificare problemi di interpretazione

La VEQ non identifica errori legati ad una stimolazione inadeguata o a tecniche di raccolta con scarsa resa.

Il College of American Pathologists (CAP) avviò un programma di verifica esterna della qualità nel 1994. Vengono distribuite soluzioni acquose. Il valore target fissato è uguale alla media di tutti i metodi  $\pm 10$  mmol/L o, se maggiore,  $\pm 15\%$ . I dati raccolti tra il 1994 e il 1998 dimostrarono che il CV per il cloro e i metodi conduttivimetrici era poco disperso, attestandosi rispettivamente tra 5.1-5.5% e tra 1.8-2.6%<sup>(83)</sup>.

Livello di evidenza III

Il Royal College of Pathologists, Australasia (RCPA) ha avviato un programma di verifica esterna della qualità per gli elettroliti nel sudore<sup>(89)</sup>. I limiti di performance consentiti per cloro (e sodio) sono fissati a  $\pm 2$  mmol/L per concentrazioni fino a 20 mmol/L e a  $\pm 10\%$  per concentrazioni superiori a 20 mmol/L.

Livello di evidenza IV

La UK External Quality Assurance Scheme ha iniziato uno studio pilota nel Giugno 1999<sup>(67)</sup>. Dopo una fase pilota, sono stati inviati 5 campioni nell'arco di 1 anno (Maggio 2000-Maggio 2001). Lo schema attualmente impiega soluzioni acquose di cloruro di sodio,

cloruro di potassio e fosfato di potassio per simulare la reale composizione elettrolitica del sudore. Sono state usate concentrazioni in un ampio range (tra 5 e 90 mmol/L).

193 laboratori (di cui 180 in Inghilterra) stanno eseguendo le analisi del test del sudore:

- 98 eseguono sodio e cloro
- 24 eseguono solo cloro
- 21 eseguono solo misure conduttivimetriche
- 20 eseguono solo sodio
- 20 eseguono sodio, cloro e misure conduttivimetriche
- 6 eseguono cloro e misure conduttivimetriche
- 3 eseguono sodio e misure conduttivimetriche
- 1 esegue solo osmolalità

C'è un rapporto di 60:40 tra laboratori che collezionano sudore con sistema Wescor e con carta da filtro.

Dai dati limitati raccolti fino ad ora, si evince che le concentrazioni di sodio e cloro misurate corrispondono ai valori pesati di cloruro di sodio. Le misure di conduttività non corrispondono alle concentrazioni degli equivalenti. Le misure di conduttività hanno la migliore performance tra laboratori con CV <5%, rispetto alle misure di cloro con CV tra 5 e 10% e misure di sodio con CV tra 5 e 7% per concentrazioni di 50 mmol/L.

I dati preliminari sull'inaccuratezza e la consistenza indicano che le misure conduttivimetriche sono quelle meno disperse; la performance delle misure sia del cloro che del sodio mostrano invece una dispersione più ampia.

**Livello di evidenza III**

Gli Standards CPA e le linee guida<sup>(27)</sup> stabiliscono che i centri devono partecipare a verifiche esterne di qualità approvate corrispondenti al proprio repertorio e devono cercare l'evidenza di una performance soddisfacente. Ove non esistono tali schemi accreditati per un test particolare, i laboratori sono incoraggiati a partecipare a programmi non approvati o a programmi pilota.

**Livello di evidenza IV**

**I laboratori devono partecipare a programmi di verifica esterna della qualità appropriati.**

**Livello globale di evidenza IV**

5.5 Concentrazioni di sodio e cloro e rapporti Na/Cl

Le linee guida NCCLS<sup>(19)</sup> stabiliscono che entrambi gli analiti potrebbero essere proporzionalmente o aumentati o diminuiti. Valori discordanti possono indicare problemi di raccolta o di analisi.

Generalmente i valori di cloro e sodio normali si aggirano intorno a 15 mmol/L.

**Livello di evidenza IV**

I dati forniti dal sottogruppo dei laboratori inglesi e i dati successivamente raccolti da 8 grandi centri mostrò che per 1571 pazienti non FC l'inaccuratezza media di sodio e cloro era di 5.2 mmol/L; i limiti di confidenza del 95% erano di -8.4 e +18.9 mmol/L. Di 2409

risultati tra i pazienti FC il più alto valore di cloro riportato fù di 143 mmol/L e il più alto valore di sodio di 135 mmol/L<sup>(12)</sup>.

Livello di evidenza III

Le concentrazioni di sodio e cloro nel sudore non supera 160 mmol/L<sup>(90)</sup>.

Livello di evidenza IIb

Possono essere causa di concentrazioni oltre 160 mmol/L: errori di laboratorio, sindrome di Munchausen (incluso 'by proxy')<sup>(91)</sup> e lo pseudoiperaldosteronismo<sup>(92)</sup>.

Livello di evidenza IV

**I risultati che non sono fisiologici, ad esempio oltre 150 mmol/L, dovrebbero essere messi in dubbio.**

Livello globale di evidenza IIb

**Per le misure conduttivimetriche il limite fisiologico superiore è stato fissato a 170 mmol/L, sostituendo la concentrazione di cloro di 150 mmol/L nella equazione di regressione di Hammond ([cloro]=0,974 x conduttività – 15.2)(69).**

Livello di evidenza I

#### 5.6 Percentuale di insuccessi

Un campione insufficiente può essere conseguente ad un processo inadeguato di raccolta o a variabilità individuale, inclusa l'età (vd. sezione 2), la razza e le condizioni della cute. Un'alta % di insuccessi può anche suggerire una scarsa preparazione tecnica del personale. Il peso (o il volume) del sudore dovrebbero essere sempre monitorati per determinare la % di bambini su cui non si può ottenere una adeguata quantità di sudore e annotare ogni trend (vd. sezione 4.1.3 per la definizione di peso adeguato del sudore). Questa % può variare con la popolazione di pazienti. Le differenze nella resistenza della cute a causa dell'etnia e della variabilità individuale possono portare ad un insufficiente campionamento. LeGrys<sup>(93)</sup> trovò una % di campioni insufficiente pari a 4.7% nel periodo neonatale e pari a 1,6% in tutte le altre fasce di età. I sistemi di raccolta possono variare in performance. Hammond<sup>(69)</sup> calcolò una % di campioni insufficienti dello 0.7% per campioni raccolti su carta da filtro o garza e una % del 6.1% usando il sistema Macroduct Wescor, sebbene Heeley<sup>(70)</sup> riportò solo un 1.4% con questo ultimo sistema. Denning<sup>(53)</sup> riportò una % di campioni insufficienti pari a 1.9% usando la iontoforesi e la raccolta su garza.

Livello di evidenza III

L'NCCLS<sup>(19)</sup> stabilisce che la % di campioni insufficienti non deve superare il 5% (a meno che molti pazienti testati non siano sotto 1 mese di età).

La maggior parte dei laboratori (79.5%) raggiungono questo obiettivo con successo<sup>(94)</sup>. Quando fù valutata la % di insuccessi in rapporto al metodo usato, si evidenziò che l'83.2% di coloro che usavano garza o carta da filtro e il 73.5% di coloro che usavano il sistema Macroduct aveva una % di insuccessi del 5% o meno.

Livello di evidenza III

I dati da 12 grandi centri inglesi dimostrò una % di insuccessi per i primi test del sudore, corretti ad  $1\text{gr}/\text{m}^2/\text{min}$ , compresi tra <1 e 28%. Tutti i centri, eccetto uno, raggiunsero una % di insuccessi <10%; 3 centri su 12 raggiunsero una % di insuccessi <5%<sup>(12)</sup>.

Livello di evidenza III

% di ripetuti può variare in base al soggetto, in particolari fasce di età. I centri di 3° livello possono avere % di ripetuti più alte a causa di una maggiore quantità di pazienti molto giovani o difficili (cioè che non sudano facilmente)<sup>(12)</sup>.

In accordo con LeGrys<sup>(94)</sup> un grande centro FC riportò una % di insuccessi del 25% in pazienti testati tra 2-4 settimane di età invece del 3.6% in pazienti di tutte le altre fasce di età.

Livello di evidenza IV

**Sulla base della performance raggiunta in Inghilterra un limite di insuccessi pari al 5% sarebbe ragionevole. Il 10% dovrebbe essere raggiunto da tutti i centri.**

**I centri dovrebbero monitorare la % di ripetuti ed indagare ogni aumento della % di campioni insufficienti.**

Livello globale di evidenza IV

#### 5.7 Verifica della performance/Audit

La Qualità può essere verificata raccogliendo dati sugli intervalli e le medie della popolazione, sulla % di test ripetuti (anche per operatore) e l'esito finale di tutti i risultati positivi e intermedi. Le medie e gli intervalli di popolazione possono essere calcolati per identificare ogni shift della performance del metodo nel tempo. La verifica esterna della qualità è uno strumento importante per verificare la performance (vd. sezione 5.4).

Livello di evidenza IV

E' buona pratica clinica seguire tutti i risultati positivi e border-line (vd. raccomandazioni per audit, sezione 8).

Livello di evidenza IV

#### 6. Intervalli di riferimento e interpretazione

Una concentrazione di cloro nel sudore  $>60\text{ mmol}/\text{L}$  è consistente con una diagnosi di fibrosi cistica<sup>(95,96)</sup>. Questo risultato dovrebbe comunque essere interpretato nel contesto dell'età e del fenotipo dei pazienti. Si pone diagnosi di FC quando si ha una concentrazione di cloro nel sudore  $>60\text{ mmol}/\text{L}$  in un paziente con una o più caratteristiche cliniche tipiche del fenotipo FC, un test di screening neonatale positivo o una familiarità per FC (fratello/sorella affetta)<sup>(96)</sup>. Le misure del sodio nel sudore sono meno affidabili, poiché concentrazioni comprese tra 60 e 80 mmol/L si riscontrano anche in pazienti non FC, specialmente negli adulti. La presenza di 2 mutazioni del gene CFTR, note per causare FC, può costituire una ulteriore conferma, ma la dimostrazione delle mutazioni non è necessaria per formulare una diagnosi di FC. La diagnosi genetica di FC attraverso

la dimostrazione di 2 mutazioni del gene CFTR (note per essere associate con la clinica della patologia) non necessita di conferma con un test del sudore.

### **6.1 Concentrazioni di sodio e cloro nel sudore**

Molti studi hanno pubblicato gli intervalli di riferimento per gli elettroliti nel sudore sia per soggetti normali che affetti da FC. Quelli che seguono sono i maggiori studi che riportano le concentrazioni di cloro in soggetti FC e in vari gruppi di controlli sani. Molti di questi studi sono stati condotti prima che fosse disponibile l'indagine genetica, così alcuni soggetti arruolati tra i controlli potrebbero avere avuto la FC o disordini correlati alla FC. Solo i primi 2 studi riportano le mutazioni genetiche e le concentrazioni di cloro nel sudore.

#### **(a) Studio Wisconsin<sup>(97)</sup>**

In uno studio condotto su bambini il test del sudore era stato correttamente eseguito nel 99.3% di 725 bambini con una media (intervallo di confidenza del 95%) del cloro normale su sudore = 10.6 (9.9-11.3) mmol/L.

I pazienti FC che erano omozigoti per la mutazione DF508, eterozigoti composti per la DF508 o che avevano altri 2 alleli mutati, avevano concentrazioni medie del cloro nel sudore pari a 100, 97,6 e 99,6 mmol/L (vd. Tab. 1). I portatori sani eterozigoti FC avevano una concentrazione media del cloro = 14.9 (13.4-16.4) mmol/L che è significativamente più alta rispetto ai bambini senza mutazioni FC. Da questi dati calcolarono su 184 bambini senza alleli DF508 che 30 mmol/L è il limite superiore di normalità, calcolato come media  $\pm$  2 DS. La media + 3 DS per il gruppo di 128 bambini portatori eterozigoti FC era di 40 mmol/L. Gli autori conclusero che per i bambini il limite superiore dell'intervallo di normalità dovesse essere spostato a 40 mmol/L.

Livello di evidenza IIb

#### **(b) Studio genotipo/fenotipo<sup>(98)</sup>**

Furono riportate le concentrazioni di cloro nel sudore di 798 pazienti studiati dal Consorzio Genotipo/Fenotipo. Questo studio incluse pazienti in un ampio range di età. In 328 pazienti omozigoti per la DF508 riportarono una concentrazione di cloro media (DS) nel sudore di 106 (22) mmol/L (vd. Tab. 2). Gli eterozigoti composti DF508 (esclusi i DF508/R117H) ebbero una concentrazione media di cloro nel sudore compresa tra 100 (20) e 110 (18) mmol/L. Questi non furono significativamente differenti dai pazienti DF508/DF508. Le concentrazioni di cloro nel sudore risultarono significativamente più basse per gli eterozigoti composti DF508/R117H con una media di 82 (19) mmol/L. Non vennero riportati valori per i soggetti normali in questo studio.

Livello di evidenza III

**(c) Studio Birmingham<sup>(63)</sup>**

20 pazienti adulti con FC ebbero una concentrazione media (intervallo) di cloro nel sudore pari a 106 (81-122) mmol/L rispetto alla media di 31 (14-48) mmol/L per i soggetti sani e a 33 (13-52) mmol/L per i soggetti con patologia toracica. Furono misurate anche le concentrazioni di sodio e si dimostrò che una concentrazione di cloro >70 mmol/L era più specifica che una contrazione di sodio >60 mmol/L per la diagnosi di FC.

Livello di evidenza IIb

**(d) Studio Ohio<sup>(99)</sup>**

Questo studio esaminò le concentrazioni di cloro in 187 adulti che non avevano FC. 166 avevano un disordine respiratorio e 21 erano sani. Questi furono confrontati con 13 soggetti adulti con FC. La concentrazione media (DS) di cloro nel sudore negli adulti con FC risultò 101 (7) mmol/L, significativamente più alta rispetto agli altri gruppi in cui la media risultò di 20.9 (15.4) mmol/L per i soggetti asmatici e 38.2 (28.7) mmol/L per soggetti affetti da pancreatite (la pancreatite idiopatica è stata successivamente identificata come disordine CFTR correlato). Questo studio fu eseguito prima della scoperta del gene FC e può avere incluso soggetti con genotipo FC o eterozigoti per FC. In questo studio il 99% dei soggetti ritenuti non FC avevano concentrazioni di cloro nel sudore < 70 mmol/L e il 96% < 60 mmol/L.

Farmaci come i B<sub>2</sub>-agonisti, i corticosteroidi, gli antibiotici e le teofilline non influenzarono la concentrazione di cloro nel sudore nei gruppi non-FC.

Livello di evidenza III

**(e) Studio Bristol e Birmingham<sup>(62)</sup>**

Questo studio esaminò retrospettivamente 1390 tests su 1100 bambini di età compresa tra 1 mese e 16 anni. I valori medi non furono riportati. 105 risultati provenivano da pazienti FC. 10 tests da 7 pazienti con FC davano concentrazioni di sodio nel sudore <60 mmol/L, ma nessuno di questi tests aveva concentrazioni di cloro <70 mmol/L.

Livello di evidenza III

**(f) Studio New York<sup>(100)</sup>**

Questo vecchio studio esaminò le concentrazioni di cloro nel sudore di 50 pazienti FC e 50 controlli. I pazienti con FC avevano una concentrazione media di cloro di 106 mmol/L e i controlli di 32 mmol/L. Non furono riportate nessuna SD o SE. 3 controlli ebbero una concentrazione di cloro nel sudore >60 mmol/L e 3 pazienti FC una concentrazione di cloro nel sudore <60 mmol/L. Fu dimostrata una considerevole maggiore sovrapposizione esaminando le concentrazioni di sodio nel sudore, rispetto al cloro.

Livello di evidenza III

### **(g) Studio Hopkins<sup>(34)</sup>**

Nello studio originale, che descriveva il test del sudore, la concentrazione media (intervallo) di cloro nel sudore in 39 controlli fu di 21.1 (7-49) mmol/L, in 5 parenti di un soggetto FC fu di 32.5 (16-47) mmol/L e in 11 pazienti FC fu di 94.8 (80-122) mmol/L. Nessuno dei controlli ebbe una concentrazione di cloro >60 mmol/L.

Livello di evidenza III

### **(h) Raccolta di dati da 12 grandi centri in Inghilterra<sup>(12)</sup>**

Furono raccolti dati per 2409 test del sudore. Esclusi i valori erratici il limite superiore del range di normalità per il cloro nel sudore potrebbe essere definito come segue: 2 DS oltre la media = 44 mmol/L; 3 DS oltre la media = 56 mmol/L; 97,5° centile = 52 mmol/L; 2 DS oltre la media dei dati logaritmici = 54 mmol/L. Ci fu un buon accordo tra i centri sul valore medio del cloro nel sudore per i dati ripuliti dei valori erratici, ma maggiore variabilità per il n° di pazienti che erano nei percentili più alti. Questo probabilmente riflette il fatto che i pazienti con valori intermedi o anormali del test del sudore sono inviati ai loro ospedali locali. Si consiglia un cut-off di 40 mmol/L quale limite superiore cautelativo del range di normalità che minimizzerebbe i falsi negativi nei pazienti con FC. Risultati >60 mmol/L sono chiaramente patologici e quelli nella regione intermedia (40-60 mmol/L) necessitano di un re-test del sudore e di ulteriori indagini.

Livello di evidenza III

### **6.2 Variazione nelle concentrazioni di cloro con l'età**

Uno studio<sup>(86)</sup> su 112 controlli appaiati a 112 soggetti con FC di età compresa tra 0 e 40 anni dimostrò un incremento statistico del cloro nel sudore per i bambini normali di età compresa tra 1 e 12 anni, ma nessun incremento per i bambini FC. Nei soggetti normali oltre i 12 anni di età non c'era variazione di cloro in relazione all'età, mentre i pazienti FC più adulti mostrarono una caduta dei valori di cloro con l'età. L'entità delle variazioni con l'età non fu tale da causare alcuna confusione di ordine diagnostico – i pazienti con FC di tutte le età ebbero valori di cloro >60 mmol/L. In un sottogruppo di pazienti con valori del cloro intermedi (tra 50-70 mmol/L) alcuni in seguito mostrarono di avere mutazioni FC e malattia atipica<sup>(101)</sup>. Nessuno di questi pazienti sarebbe stato perso usando un limite superiore per il cloro di 40 mmol/L. Un limite superiore di 40 mmol/L per il cloro nel sudore è appropriato per soggetti di tutte le età.

Livello di evidenza III

### **6.3 Studi dove si misura solo il sodio nel sudore**

Diversi altri studi hanno riportato le concentrazioni del sodio nel sudore. Poiché questa misura non è considerata sufficientemente specifica quale analita di prima scelta per la diagnosi di FC, questi non sono tenuti in molta considerazione. Il sodio aumenta con l'età, può essere affetto da altre condizioni e da farmaci ed, in generale, discrimina meno (vd. sezione 4.3.2).

Livello di evidenza III

#### 6.4 La ratio Na/Cl nel sudore

I pazienti con FC di solito hanno una ratio Na/Cl  $<1$ <sup>(62,86)</sup>. La ratio Na/Cl aumenta con l'età sia nei soggetti FC, sia nei soggetti normali, come atteso, poiché i valori di sodio aumentano con l'età più dei valori di cloro<sup>(86)</sup>.

L'uso potenziale della ratio Na/Cl quale ausilio diagnostico è stato studiato da diversi gruppi<sup>(62,66,102,103,104)</sup>.

In un piccolo studio in cui si confrontavano le ratio Na/Cl di adulti FC, con quelle di adulti normali e di soggetti con patologia toracica si evidenziò un buon potere discriminante<sup>(63)</sup>.

Livello di evidenza IIb

Comunque Kirk mostrò che combinare sodio e cloro non migliorava il potere discriminante in un gruppo di 9 adolescenti/adulti con valori di cloro intermedi<sup>(86)</sup>.

Livello di evidenza III

Augarten<sup>(5)</sup> suggerì che la ratio Na/Cl è determinata geneticamente e può essere d'ausilio nello stabilire la diagnosi di FC in pazienti con un test del sudore borderline; in pratica, per risultati intermedi con una ratio Na/Cl  $<1.0$  si dovrebbe prendere in considerazione la diagnosi di FC.

Livello di evidenza III

Recentemente Massie ha esaminato la relazione tra Cl e Na in soggetti omozigoti ed eterozigoti per la DF508 identificati tramite screening neonatale<sup>(105)</sup>. La ratio Cl/Na aveva un Valore Predittivo Positivo del 37%, quindi non risultò utile nella diagnosi di bambini screenati in questa situazione.

Livello di evidenza III

**Il valore della ratio Na/Cl quale test discriminatorio per pazienti FC con valori di cloro nel sudore normali o intermedi è a tutt'oggi da definire.**

**Livello globale di evidenza III**

#### 6.5 Conduttività del sudore

Hammond<sup>(69)</sup> effettuò uno studio su larga scala confrontando Na, Cl e misure conduttivimetriche. La correlazione lineare migliore è quella delle misure conduttivimetriche vs sodio + potassio. La relazione Cl vs misure conduttivimetriche mostra che 57 mmol/L di equivalenti di NaCl corrisponde a un valore di cloro di 40 mmol/L, mentre il valore di cut-off raccomandato dalle Linee Guida NCCLS<sup>(19)</sup> e dalla CFF di 50 mmol/L di equivalenti di NaCl corrisponderebbe a un valore di cloro di 33 mmol/L e includerebbe un significativo numero di soggetti normali.

Livello di evidenza IIb

Lo studio di Heeley<sup>(70)</sup> in cui si confrontano misure simultanee di Na, Cl, equivalenti di NaCl e osmolalità mostrò che una concentrazione di Cl di 38 mmol/L è 3 DS oltre la media della popolazione normale. Il corrispettivo valore in equivalenti di NaCl è di 67 mmol/L.

Livello di evidenza IIb

Il manuale operativo datato 1997<sup>(106)</sup> dice che, data una media di equivalenti di NaCl di 33 mmol/L, 3DS = 67 mmol/L (n = 471). La loro raccomandazione è “la maggioranza dei valori normali cadrà sotto 60 mmol/L di equivalenti di NaCl; la maggioranza dei valori positivi cadrà oltre 90 mmol/L di equivalenti di NaCl. Usare la massima cautela nell’interpretare ogni risultato nella regione intermedia tra 60 e 90 mmol/L di equivalenti di NaCl”. In un aggiornamento successivo del manuale operativo (Aprile 2000), 90 mmol/L è stato sostituito con 80 mmol/L.

Livello di evidenza IV

Un gruppo di 1732 misure conduttivimetriche eseguite in 13 laboratori inglesi mostrò un eccellente accordo con i dati pubblicati. La conduttività media dei dati ripuliti dei valori estremi era di 39 mmol/L di equivalenti NaCl. 2 DS oltre la media corrispondeva a un valore di conduttività di 61 mmol/L di equivalenti di NaCl<sup>(54)</sup>.

Livello di evidenza III

Misure ripetute della conduttività del sudore in 20 bambini sani, 20 adulti sani e 15 pazienti FC per verificare la variazione inter- ed intra-individuale deponavano per un cut-off di 60 mmol/L per minimizzare retest inutili, senza incorrere in mancate diagnosi di FC<sup>(107)</sup>.

Livello di evidenza IIb

**Un valore sotto 60 mmol/L (equivalenti di NaCl) è associato inverosimilmente con FC. I valori oltre 90 mmol/L sono a supporto di una diagnosi di FC. La fibrosi cistica non dovrebbe essere diagnosticata basandosi solo su misure conduttivimetriche. La conferma dovrebbe essere effettuata dosando il cloro nel sudore o attraverso l’indagine genetica (vd. anche sezione 4.3.4). I valori intermedi (cioè compresi tra 60 e 90 mmol/L) richiedono ulteriori indagini accanto al dosaggio cloro e/o l’analisi genetica.**

Livello globale di evidenza IIb

## 6.6 Genotipo e valori intermedi degli elettroliti nel sudore

Diversi studi hanno esaminato la relazione tra test del sudore con valori intermedi e genotipo FC. Desmarquest e coll. studiarono 24 individui con concentrazioni di cloro nel sudore nell’intervallo 40-60 mmol/L<sup>(108)</sup>. L’età media in cui era stato effettuato il test del sudore fu di 4.8 anni e i pazienti furono seguiti per 10 anni. Dei 24 pazienti furono identificate 15 mutazioni del gene CFTR. 3 pazienti erano portatori di 2 mutazioni sicuramente FC. L’allele 5T fu identificato in altri 4 bambini. Le mutazioni associate con livelli di cloro intermedi/bassi furono la 3849+10kbC->T e la P67L<sup>(7,101,109)</sup>. Gli eterozigoti DF508 con associata una mutazione splicing o missense erano associati con concentrazioni di cloro significativamente più basse degli omozigoti DF508<sup>(110)</sup>.

Un altro studio suggerisce che in un paziente con concentrazione di cloro compresa tra 40 e 60 mmol/L una ratio Cl/Na di 1 o >1 sia a sostegno di una diagnosi di FC. Comunque una ratio <1 non esclude la diagnosi<sup>(86)</sup>. In un programma di screening neonatale 122 eterozigoti per la DF508 con una tripsina immunoreattiva elevata furono identificati con un valore di cloro nel sudore <60 mmol/L. Fu quindi intrapresa l'indagine allargata delle mutazioni. 4 bambini ebbero una concentrazione di cloro compresa tra 40 e 60 mmol/L e 2 di questi mostrarono le caratteristiche fenotipiche FC a 12 mesi di età<sup>(111)</sup>.

Livello di evidenza IV

#### 6.7 Altri disordini associati con mutazioni FC

Sono state fino ad oggi identificate diverse condizioni morbose associate a 1 o 2 mutazioni nel locus FC. Queste condizioni morbose includono alcuni pazienti con assenza congenita bilaterale dei vasi deferenti, pancreatite idiopatica e forse la sinusite cronica<sup>(112,116)</sup>. In queste condizioni le concentrazioni di cloro nel sudore possono essere intermedie o anormali. La decisione di classificare tali condizioni come FC resta una decisione che, caso per caso, spetta al medico. Una classificazione è stata suggerita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità<sup>(117)</sup>.

#### 6.8 Altre malattie associate con elevate concentrazioni di elettroliti nel sudore

Molte condizioni sono state associate con anomalie delle concentrazioni di sodio e cloro nel sudore. Nella maggior parte di questi studi solo uno o due pazienti vengono segnalati e in molti casi gli elettroliti nel sudore ritornano a valori normali una volta trattata la condizione acuta. Poche di queste malattie sono fenotipicamente simili alla fibrosi cistica e di solito non rappresentano un problema nella diagnosi differenziale. Questo argomento è stato passato in rassegna da diversi autori<sup>(95,118)</sup>, non rappresenta uno degli obiettivi di queste linee guida e non esiste nessuna raccomandazione al riguardo.

#### 6.9 Indicazioni per ripetere un test del sudore, cioè quando ripeterlo

E' stato da sempre insegnato che un test del sudore deve essere ripetuto prima di confermare la diagnosi di FC. Comunque, se il genotipo conferma la diagnosi di FC allora, ripetere un test del sudore, può non essere necessario.

Si raccomanda di ripetere un test del sudore quando il risultato è positivo o borderline e il genotipo non è conclusivo.

Se sussiste il dubbio che un test del sudore negativo non correli con il quadro clinico e se l'indagine genetica non è conclusiva, il test del sudore dovrebbe essere ripetuto. Tutti i valori borderline non confermati dal genotipo dovrebbero essere ripetuti.

Livello di evidenza IV

#### 6.10 Ulteriori indagini

##### (a) Analisi del genotipo

L'analisi del genotipo può definire la diagnosi di FC. Trovare 2 mutazioni in un paziente con un test del sudore borderline conferma una diagnosi di FC. Un valore intermedio di cloro (40-60 mmol/L), la presenza di 1 mutazione e un'espressione fenotipica FC può

essere sufficiente a confermare la diagnosi di FC. E' impraticabile indagare tutte mutazioni usando la PCR e la maggior parte dei laboratori esaminano solo 15-20 mutazioni. Questa indagine rileva il 90-95% delle mutazioni nella maggior parte delle popolazioni dell'Europa Nord Occidentale.

Livello di evidenza III

(b) La misura dei potenziali nasali

Le cellule epiteliali delle cavità nasali esprimono la proteina CFTR, e in fibrosi cistica, dove la funzione del CFTR è alterata, anche il trasporto di sodio e cloro è perciò alterato. Questo determina una maggiore differenza di potenziale elettrico trans-epiteliale nei pazienti FC rispetto ai soggetti normali. La misura dei potenziali nasali con un catetere flessibile è talvolta un utile test di conferma per la FC<sup>(95,119)</sup>. Ci sono 3 specifiche caratteristiche che distinguono i pazienti con FC dai soggetti sani:

- a) potenziale nasale basale più negativo
- b) b) maggior inibizione della differenza di potenziale perfondendo amiloride
- c) c) nessuna o scarsa modificazione del potenziale perfondenndo una soluzione a basso contenuto di cloro con isoproterenolo, indicando un'assenza di secrezione di cloro mediata da CFTR.

Questo metodo è tecnicamente più difficoltoso del test del sudore e dovrebbe essere eseguito solo in laboratori con considerevole esperienza. Questo test può avere un peso nel definire la diagnosi in pazienti con test del sudore borderline. Le misure di potenziale nasale basale in un gruppo di 18 pazienti FC con test del sudore < 70 mmol/L erano tutte più negative di -25 mV, significativamente più negative rispetto ai controlli sani, ma non significativamente differenti rispetto ai controlli FC<sup>(120)</sup>.

Livello di evidenza III

(c) Soppressione da mineralcorticoidi

Negli individui sani, ma non nei pazienti FC, la somministrazione orale di fludrocortisone (5 mg) causa una riduzione nella concentrazione di sodio nel sudore. Non ci sono dati relativi all'effetto sulle concentrazioni di cloro. Questo test non è ampiamente usato.

Livello di evidenza IV

Tabella 1

Studio Wisconsin

	n	Età (settimane) media (DS)	Cloro (mmol/L) medio [Interv. Confid. 95%]
Bambini sani	184	9.3 (5.3)	10.6 [9.9 - 11.3]
Portatori sani eterozigoti DF508	128	8.8 (5)	14.9 [13.4 - 16.4]
DF508/DF508	61	10.5 (9.9)	100 [97.6 - 102.4]
DF508/sconosciuta	47	9.3 (9.3)	97.6 [93.1 - 102.1]
Sconosciuta/sconosciuta	7	16.5 (17.3)	99.6 [86.5 - 112.7]

Tabella 2

Studio genotipo/fenotipo

	n	Età (anni) media (DS)	Cloro (mmol/L) medio (DS)
DF508/DF508	328	13 (9)	106 (22)
DF508/G542X	147	12 (9)	109 (23)
DF508/R117H	20	24 (10)	82 (19)+
X/X	16	12 (10)	105 (19)

+ p<0,001 vs DF508

7. Responsabilità del test e della formazione

**7.1 Chi dovrebbe eseguire il test? necessità di esperienza e formazione**

La raccolta del sudore viene eseguita da varie figure professionali, tra cui: laboratoristi, medici, infermieri, fisioterapisti. Le procedure analitiche per la misura degli elettroliti nel sudore sono di solito eseguite dai Dipartimenti di Chimica Clinica. Il test del sudore richiede attenzione ai dettagli, e la più comune causa di un'incorretta diagnosi sta nell'inaccurata esecuzione o interpretazione del test, eventualità più probabile laddove il test viene eseguito solo occasionalmente<sup>(80,82)</sup>. Schwachman e Mahmoodian<sup>(82)</sup> dicono che 'l'errore più grande nel test del sudore è probabilmente attribuibile all'inesperienza del tecnico impropriamente formato e che esegue il test raramente, forse 3 o 5 volte/mese'.

Livello di evidenza IV

Posizione Inglese

In Inghilterra c'è un'enorme varietà di carichi di lavoro. I dati da un audit in Inghilterra<sup>(10)</sup> e da 4 audit regionali<sup>(46,47,57,122)</sup> sono mostrati nella tabella che segue.

	<b>U.K. 2000</b>	<b>N.W. Thames 1996</b>	<b>Trent 1999</b>	<b>South West 1998</b>	<b>West Midlands 1995</b>
N° di Centri che hanno fornito i dati	30	39	15	14	19
N° test del sudore/anno	30-400 (media 100)	Non disponibile	7-150	15-200 (media 55)	30-200
N° test del sudore/diagnosi	5-152 (media 30)	Non disponibile	7.5-100	Non disponibile	Non disponibile
N° test del sudore /operatore/anno	5-268 (media 50)	Tutti>10	1-76 (media 15)	9-200 (media 33)	3-50 (media 11)

Nella maggior parte dei centri, il personale di laboratorio (n=22) che esegue la raccolta del sudore varia dal membro più giovane, fino al Direttore dell'Unità; la maggior parte dei centri impiega tecnici di laboratorio (n=12). Sulla base dell'audit in Inghilterra, la maggior parte dei centri deve eseguire una media di 30 test del sudore normali ogni 1 positivo. La maggior parte dei centri ha ristretto la procedura di raccolta del sudore a uno o due operatori esperti.

Livello di evidenza III

## Consensus Guidelines

Gli Standards Welsh dicono che l'analisi deve essere eseguita da personale laboratoristico specificamente addestrato. La raccolta del sudore può essere eseguita da personale di laboratorio o infermieristico, che deve in ogni caso essere formato dal laboratorio. Un minimo di 10 procedure di raccolta/operatore/anno dovrebbe essere eseguito per mantenere un buon livello della tecnica<sup>(28)</sup>.

Livello di evidenza IV

Le linee guida NCCLS raccomandano che il test del sudore venga eseguito solo in quei presidi dove si esegue un numero sufficientemente ampio di test per mantenere un buon livello di qualità<sup>(19,123)</sup>, sebbene non ci siano dati statisticamente significativi che correlano la performance con il carico di lavoro.

Livello di evidenza IV

## UK NEQAS

I dati da UK NEQAS<sup>(67)</sup> mostrano che approssimativamente ogni anno in Inghilterra vengono eseguiti 15000 test del sudore. Il numero medio di test/anno eseguiti da ciascun centro in Inghilterra è 100 (media = 60) con un range di 2-500.

Mentre non c'è una relazione diretta tra carico di lavoro e frequenza di errore di interpretazione (alcuni laboratori con piccoli carichi di lavoro non hanno commesso errori di interpretazione), c'è una tendenza per le più alte frequenze di errore ad essere associate con i laboratori che hanno minori carichi di lavoro. I laboratori che eseguono più di 100 test/anno hanno commesso a tutt'oggi meno di 2 errori; il 50% di quei laboratori che hanno eseguito 2 o più errori eseguono 50 test/anno o meno. Dei 75 errori di interpretazione, 39 erano basati su risultati numerici "analiticamente corretti", confermando che nei vari laboratori si usano criteri interpretativi diversi (dati non pubblicati; cortesia di UK NEQAS)<sup>(67)</sup>

Livello di evidenza III

**In conclusione, quindi, non ci sono dati scientifici che mettono in relazione il livello di performance del test con la frequenza di esecuzione dello stesso o il livello di formazione o il carico di lavoro. Comunque, è probabile che la familiarità con la procedura e la frequenza di analisi possa influenzare la performance del test.**

**Per questa ragione non è accettabile per una organizzazione o un individuo eseguire pochi test del sudore. I campioni di sudore possono essere raccolti in modo soddisfacente da varie figure professionali sanitarie. Comunque, eseguire un numero minimo di raccolte di sudore all'anno (50 test/anno e 10 test/operatore/anno) è un requisito minimo per mantenere un buon livello di qualità. Tutto il gruppo di professionisti che esegue il test del sudore deve essere pienamente formato e formalmente autorizzato.**

Livello globale di evidenza IV

## 7.2 Responsabilità

### Analisi

Il test del sudore è un test chimico e la procedura analitica è più appropriatamente parte del repertorio di un dipartimento di chimica clinica.

La compliance con gli Standards CPA<sup>(27)</sup> richiede che lo staff debba essere appropriatamente qualificato per il lavoro cui è preposto.

La responsabilità dell'esecuzione dei test del sudore, incluse la formazione e la rivalidazione dello staff, sia per la raccolta che per l'analisi dovrebbe essere di un consulente chimico clinico (o figura equivalente).

Livello di evidenza IV

## 8. Raccomandazioni per l'audit

I punti chiave per l'audit a livello locale sono:

### 8.1 la performance del test (vd. anche la sezione 5: Qualità)

- per monitorare la performance del controllo di qualità interno
- per monitorare la performance della verifica esterna della qualità
- per monitorare le % di test ripetuti/test falliti

### 8.2 la relazione tra i risultati del test del sudore e la diagnosi

- per raccogliere dati su tutti i risultati dei test del sudore positivi e intermedi e relazionarli alla diagnosi. Si potrebbero includere i dati provenienti dai programmi di screening neonatale

### 8.3 eventi avversi

- natura e numero di ciascun evento (Es: bruciature, bolle) associate con la procedura di iontoforesi

## 9. Raccomandazioni per ulteriori indagini

Quelle riportate di seguito raccomandazioni suggerite, in quanto iniziative nazionali/multicentriche che richiedono ulteriori indagini:

- per definire un database nazionale dei risultati dei test del sudore intermedi e atipici da poter correlare con il genotipo in collaborazione con il database FC inglese.

In particolare per:

- raccogliere dati dalla popolazione inglese
- ottenere dati su risultati intermedi del test del sudore e sui pazienti FC atipici
- ottenere dati sui gruppi di età molto giovane e sugli adulti
- per avviare uno studio multicentrico con l'obiettivo di stabilire un algoritmo basato sull'evidenza per indagare i risultati intermedi del test del sudore
- per avviare uno studio multicentrico con l'obiettivo di comparare le misure di conduttività vs il cloro nel sudore ( $\pm$  sodio) quale test per la diagnosi di FC
- per valutare l'informazione al paziente

## BIBLIOGRAFIA

1. Dodge JA, Morison S, Lewis PA, Colen EC, Geddes D, Russell G, Littlewood JM, Scott MT (The UK Cystic Fibrosis Survey Management Committee). Incidence, population and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968-95. *Arch Dis Child* 1997;77:493-496
2. Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M, Knowles HR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatrics* 1998;132:255-259
3. Wright SW and Morton NE. Genetic studies on cystic fibrosis in Hawaii. *Am J Hum Genet* 1968;20:157-169
4. Spencer DA, Venkataraman M, Higgins SM, Stevenson K, Weller PH. Cystic fibrosis in children from ethnic minorities in the West Midlands. *Respiratory Medicine* 1994;88:671-675
5. Augarten A, Hacham S, Kerem E, Kersm BS, Szeinberg A, Laufer J, Doolman R, Altshuler R, Blau H, Bentur L, Gazit E, Katznelson D, Yahar Y. The significance of sweat Cl/Na ratio in patients with borderline sweat test. *Pediatr Pulmonol* 1995;20:369-371
6. Stern RC, Boat TF, Abramowski CR, Matthews LW, Wood RE nad Doershuk CF. Intermediate-range sweat chloride concentrations and pseudomonary bronchitis. *JAMA* 1978; 239:2676-2680
7. Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A, Gorvoy JD, Quittell L, Friedman KJ, Silverman LM, Boucher RC and Knowles MR. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Eng J Med* 1994;331:974-980
8. Augarten A, Kerem B-S, Yahav Y, Noiman S, Rivlin Y, Tal A, Blau H, Ben-Tur L, Szeinberg A, Kerem E, Gazit E. Mild cystic fibrosis and normal or borderline sweat test in patients with the 3849+10kbC->T mutation. *Lancet* 1993;342:25-26
9. Strong TV, Smit LS, Turpin SV, Cole JL, Tom Hon C, Markiewicz D, Petty TL, Craig MW, Rosenow EC, Tsui L-C, Lannuzzi MC, Knowles MR and Collins FS. Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. *N Eng J Med* 1991;325:1630-1634
10. Kirk JM. Inconsistencies in sweat testing in UK laboratories. *Arch Dis Child* 2000;82:425-427
11. Vicky LeGrys, School of Medicine, Division of Clinical Laboratori Science, Department of Medical Allied Professions, The University of North Carolina, CB#7145, Medical School, Wing E, Chapel Hill, North Carolina 27599-7145, USA. Personal communication 2001
12. National UK Laboratori Sweat Test Subgroup 2001
13. Harpin VA, Rutter N. sweating in preterm infants. *J Pediatr* 1982;100:614-618
14. Hardy JD, Davison SHH, Higgins MU and Polycarpou PN. Sweat tests in the newborn period. *Arch Dis Child* 1973;48:1041-1043
15. Littlewood JM. The Sweat Test. *Arch Dis Child* 1986;61:1041-1043
16. MacLean C and Tripp J. Cystic fibrosis with oedema. *J Pediatrics* 1973;83-86
17. Brand PLB, Gerritsen J, Van Aalderen WMC. A baby with eczema and an abnormal sweat test. *Lancet* 1996;348:932
18. Williams J, Griffith PD, Green A, Weller PH. Sweat tests and flucloxacillin. *Arch Dis Child* 1988;63:847-848
19. LeGrys VA, Barfitt MF, Gibson LE, Hammond RB, Kraft K, Rosenstein BJ. NCCLS Sweat testing: sample collection and quantitative analysis; approved guideline.

- Second edition, US National Committee for Clinical Laboratory Standards Document C34-A2 (ISBN 1-556238-40704) 2000. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 0 1894, USA
20. Reynolds A, Great Ormond Street Hospital, London. Personal Communication
  - 20a. Pao C, Wallis C. simultaneous bilateral sweat testing – two for the price of one? *J Cystic Fibrosis* 2002;1(supp):96
  - 20b. Thorpe EL, Angel PE, Samuel CT. CT Sweat Tests: Reliability of collection procedures and analysis as indicated by between limb imprecision studies. *Proc. ACB National Meeting* 2001;102-103
  21. Report of the committee for a study for evaluation of Testing for Cystic Fibrosis. *J Pediatrics* 1976;88:711-750
  22. Schwarz V, Sutcliffe CH, Style PP. Some hazards of the sweat test. *Arch Dis Child* 1968;43:695-701
  23. Ellam SV. Improvement on the safety of sweat test equipment. *Med&Biol Eng & Comput* 1978;16:595-596
  24. Instruction Manual. Model 3500. Webster sweat collection system. Wescor Inc., Logan, Utah, 1979
  25. Macroduct sweat collection system Model 3600-SYS instruction manual. Wescor, Logan, Utah, 1983
  26. Gibson-Cooke sweat test apparatus IPS-25° instrument manual, 1998. C&S Electronics Inc., 2565 16<sup>th</sup> Avenue, Columbus, NE 68601, USA
  27. Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd., Standards and Guidelines Version 7.0 1/7/99. 45 Rutland Park, Botanical Gardens, Sheffield, S10 2PB
  28. Losty H (All Wales Clinical Biochemistry Audit Group). A Welsh Standard for Sweat Testing, (Version 2) 1999. Department of Medical Biochemistry, University of Wales, Cardiff
  29. Price CP, Spencer K. Problems associated with measuring sweat chloride concentration with an ion-specific electrode. *Ann Clin Biochem* 1977;14:171-178
  30. Szabo LV, Kenny MA, Lee W. Direct measurement of chloride in sweat with an ion-selective electrode. *Clin Chem* 1973;19:727-730
  31. Shwachman H, Mahmoodian A. pilocarpine iontophoresis sweat testing. Results of seven years experience. *Mod Probl Pediatr* 1966;10:158-182
  32. Webster HL, Quirante CG. Micro-flowcell conductometric sweat analysis for cystic fibrosis diagnosis. *Ann Clin Biochem* 2000;37:399-407
  33. Altmiller DH, Flux M, Parker KM. A patient requiring high concentration of pilocarpine nitrate to induce sweating. *Clin Chem* 1984;30:943
  34. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23:545-549
  35. kapito L, Schwachman H. Studies in cystic fibrosis: determination of sweat electrolytes in situ with direct reading electrodes. *Pediatrics* 1969;43:794-798
  36. Webster HL, Barlow WK. New approach to cystic fibrosis diagnosis by use of an improved sweat induction/collection system and osmometry. *Clin Chem* 1981;27:385-387
  37. Webster HL. Improved pilocarpine reservoir for use in sweat testing. *Clin Chem* 1982;28:2182-2183
  38. Kirk JM. Inconsistencies in sweat testing in UK laboratories. *Arch Dis Child* 2000;82:425-427
  39. Tocci PM, McKey RM V. laboratory confirmation of the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Chem* 1976;22:1841-1844

40. Webster HL. Laboratori diagnosis of cystic fibrosis. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratori Sciences* 1983;18:313-337
41. Kirk JM, Adams A, Westwood A, McCrae WM. Measurement of osmolality and sodium concentration in heated-cup sweat collection for the investigation of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem* 1983;20:369-373
42. Irlam AC. A memorable patient. The burnt arm. *BMJ* 1995;310:657
43. Rattenbury JM, Worthy E. is the sweat test safe? Some instances of burns received durino pilocarpine iontophoresis. *Ann Clin Biochem* 1996;33:456-458
44. Medical Devices Agency Safety Notice. Prevention of burns durino iontophoresis (sweat testing). MDA SN 1999 (05). Hannibal House, Eephant and Castle, London, SE1 6 TQ
45. Incident Reporting & Investigation Centre, Scottish Healthcare Supplies, Trinity Park House, South Trinity Road, Edinburgh, EH5 3 SH. Search of Database 2000
46. Downing M. trent Region sweat testing audit. *Sheffield Children's Hospital Metabolic Disease Newsletter* 1999; No. 24 (no page numbers)
47. Stone J. Results of South West Region sweat testing audit 1998 (unpublished). Chemical Pathology Department, Bristol Royal Infirmary, Marlborough Street, Bristol, B22 8 HW
48. Webster L, Lochlin H. Cystic Fibrosis screening by sweat analysis. A critical review of techniques. *Med J Aus* 1977;1:923-927
49. Simmonds E, Alfaaham M, Prosser R, Penney MD. Fractional measurements of sweat osmolality in patients with cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1989;64:1717-1720
50. Gibson LE & di Sant'Agnese PA. Studies of salt excretion in sweat. Relationships between rate, conductivity and electrolyte composition of sweat from patients with cystic fibrosis and from control subjects. *J Pediatrics* 1963;62:855-867
51. Schwarz V, Simpson NIM, Ahuja AS. Limitations of diagnostic value of the sweat test. *Arch Dis Child* 1977;52:870-874
52. Hjelm M, Brown P, Briddon A. sweat sodium related to amount of sweat after sweat test in children with and without cystic fibrosis. *Acta Paediatr Scand* 1986;75:652-656
53. Denning CR, Huang NN, Cuasay LR, Shwachman H, Tocci P, Warwick WJ, Gibson LE. Co-operative study comapring three methods of performing sweat tests to diagnose cystic fibrosis. *Pediatrics* 1980;66:752-757
54. Enquiries via ACB bulletin board and via UK NEQAS 2001
55. Kirk J, department of Pediatri Biochemistry, Royal Hospital for Sick Children, Sciennes Road, Edinburgh, EH9 1LF. Personal communication 2001
56. LeGrys VA. Stability of chloride in sweat testing. *Clinical Laboratori Science* 1993;6:156-157
57. Fahie-Wilson MN, Freedmna DB. North West Thames audit of sweat test procedure and analysis. 1995 (unpublished). Biochemistry Department, Southend Hospital, Prittlewell Chase, Westcliff on Sea, SSO ORY
58. Gibson LE, di Sant'Agnese PA. Studies of salt excretion in sweat. *Pediatrics* 1963;62:855-867
59. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosoem walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-1065
60. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning & characterisation of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-1073
61. kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-1080

62. Green A, Dodds P, Penniock C. A study of sweat sodium and chloride, criteria for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem* 1985;22:171-176
63. Hall SK, Stableforth DE, Green A. Sweat sodium and chloride concentrations – essential criteria for the diagnosis of cystic fibrosis in adults. *Ann Clin Biochem* 1990;27:318-320
64. Gleeson M, Henry RL. Sweat sodium or chloride? *Clin Chem* 1991;37:112
65. Kirk JM, Keston M, McIntosh I, Al Essa S. variation of sweat sodium and chloride with age in cystic fibrosis and normal populations: further investigations in equivocal cases. *Ann Clin Biochem* 1992;29:145-152
66. Shwachman H, Nahmoodian A, Neff RK. The sweat test: sodium & chloride values- *J Pediatr* 1981;98:576-578
67. Finlay MacKenzie. Sweat Testing Surveys. Inpublished data 2001.UK NEQAS, Wolfson EQA Laboratori, P.O. Box 3909, Birmingham, B15 2UE
68. Cystic Fibrosis Foundation Center Committee. Memo of Center Directors, May 30, 1996
69. Hammond KB, Turcias NL, Gibson LE. Clinical evaluation of the Macroduct sweat collection system and conductivity analyser in the diagnosis of Cystic Fibrosis. *J Pediatr* 1994;124:255-260
70. Heeley ME, Woolf DA and Heeley AF. In direct measurement of sweat electrolyte concentration in the laboratori diagnosis of cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2000;82:420-424
71. Mastella G, Di Cesare G, Borruso A, Menin L, Zanolla L. reliability of sweat testing by the Macroduct collection method combined with conductivity analysis in comparison with the classic Gibson & Cooke technique. *Acta Paediatr* 2000;89:933-937
72. LeGrys VA. Sweat chloride & conductivity [Letter]. *Arch Dis Child* 2001;84:450
73. Heeley M, Woolf D, Heeley A. Sweat chloride & conductivity [Letter]. *Arch Dis Child* 2001;84:450
74. Webster HL. Sweat chloride & conductivity [Letter]. *Arch Dis Child* 2001;84:150-151
75. Frey MJ. A quantitative colorimetric method for the determination of serum chloride using the Technicon RA 1000 System. *Clin Chem* 1983;29:1255
76. Weissman N, Pileggi VJ. Inorganic ions: determination of chloride. In: Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, eds. *Clinical Chemistry. Principles & techniques*. London: Harper & Row 1974:712-720
77. Barbour HM. Development and evaluation of the simultaneous determination of sweat sodium and chloride by ion – selective electrodes. *Ann Clin Biochem* 1991;28:Pt. 2 150-154
78. Northall H, York SA. Sweat sodium chloride analysis using BM Hitachi 911 ion selective electrodes. *BJ Biomed Science*, 1995;52:68-70
79. Weissman N, Pileggi VJ. Inorganic ions: sodium determination by flame photometry. In: Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JK, eds. *Clinical Chemistry: priciples & techniques*. London: Harper & Row 1974:642-644
80. Smalley CA, Addy DP and Anderson CM. Does that child really have Cystic Fibrosis? *The Lancet* 1978:415-416
81. David TJ and Phillips BM. Overdiagnosis of Cystic Fibrosis. *The Lancet*, 1982:1204-1205
82. Shwachman H and Mohmoodian A. Qualità of Sweat Test Performance in the Diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Chem* 1979;25:158-161
83. LeGrys VA. Sweat analysis proficiency testing for cystic fibrosis. *Ped Pulmonol* 2000;30:476-480

84. Rosenstein BJ, Langbaum TS. Misdiagnosis of Cystic Fibrosis. *Clin Pediatr* 1987;26:78-82
85. LeGrys VA, Wood RE. Incidence and implications of false negative sweat test reporting in patients. *Ped Pulmonol* 1988;4:169-172
86. Kirk JM, Keston M, McIntosh I, Al Essa S. Variation of sweat sodium and chloride with age in cystic fibrosis and normal population: further investigations in equivocal cases. *Ann Clin Biochem* 1992;29:145-152
87. Ayers GJ. Pathology 2000 Abstracts. Use of Vitros Direct ISE slides to measure sodium and chloride for the diagnosis of cystic fibrosis
88. Taylor RP and James TJ. Enzymatic determination of sodium and chloride in sweat. *Clin Biochem* 1996;Vol 29:33-37
89. Royal College of Pathologists of Australia (RCPA). Sweat electrolytes program. RCPA Quality Assurance Programs PTY Ltd., Flanders Medical Centre, Bedford Park, South Australia, SA 5042
90. Schulz IJ. Micropuncture studies of the sweat formation in CF patients. *J Clin Invest* 1969;48:1470-1477
91. Oresteian DM, Wasserman AL. Munchausen syndrome by proxy simulating cystic fibrosis. *Paediatrics* 1986;78:621-624
92. Hall SK. Personal communication 2002. department of Clinical Chemistry, Birmingham Children's Hospital, Steelhouse Lane, Birmingham, B4 6NH
93. LeGrys VA. Sweat testing for cystic fibrosis: profiles of patients with insufficient samples. *Clin Lab Science* 1998;6:73-75
94. LeGrys VA. Assessment of sweat-testing practices for the diagnosis of cystic fibrosis. *Arch Path & Lab Med* 2001;125:11:1420-1424
95. Rosenstein BJ. In *Cystic Fibrosis*. Hodson ME and Geddes DM. Arnold 1999, London
96. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr* 1998;132:589-595
97. Farrell PM, Kosciak RE. Sweat chloride concentrations on infants homozygous or heterozygous for F508 cystic fibrosis. *Paediatrics* 1996;97:4
98. The cystic fibrosis genotype – phenotype consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Eng J Med* 1993;329:1308-1313
99. Davis PB, Rio DS, Muntz JA, Dieckman L. sweat chloride concentration in adults with pulmonary diseases. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:34-37
100. di Sant'Agnese PA, darling RC, Perera GA et al. Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease. *Am J Med* 1953;15:777-784
101. Gilfillan A, Warner JP, Kirk J et al. P67L: a cystic fibrosis allele with mild effects found at high frequency in the Scottish population. *J Med Genet* 1998;35:122-125
102. Canciani M, Forno S, mastella G. Borderline sweat test: criteria for cystic fibrosis diagnosis. *Scand J Gastroenterol* 1988;23(suppl 143):19-27
103. Rosenstein BJ. Interpretation of sweat tests in the diagnosis of CF. *J Respir Dis* 1990;11:519-528
104. Rosenstein BJ. Sweat sodium and chloride values. *J Pediatr* 1982;100:1001-1003
105. Massie RJ, Gaskin K, van Asperen P, Wilcken B. Sweat testing following newborn screening for cystic fibrosis. *Ped Pulmonol* 2000;29(6):452-456
106. Model 3120 Sweatcheck conductivity analyser users manual, Wescor Inc, Logan, Utah. Effective 5 Aug, 97
107. van der Merwe D-E, Ubbink JB, Delpont R, Backer P, Dhath GS, Vermaak WHH. Biological variation in sweat sodium chloride conductivity. *Ann Clin Biochem* 2002;39:39-43

108. Desmarquest P, Feldmann D, tamalat A et al. Genotype analysis and phenotypic manifestations of children with intermediate sweat chloride test results. *Chest* 2000;118:1591-1597
109. Steward B, Zabner J, Shuber AP, Welsh MJ, McCray PB. Normal sweat chloride values do not exclude the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:899-903
110. Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D et al. Correlation of sweat chloride with clones of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation. *J Pediatr* 1995;127:705-710
111. Massie RJ, WiKcken B, Van Asperen P et al. Pancreatic function and extended mutation analysis in DF508 heterozygotes infants with an elevated immunoreactive trypsinogen but normal sweat electrolyte levels. *J pediatr* 2000;137:214-220
112. Chillon M, Casals T, Mercier B et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Eng J Med* 1995;332:1475-1480
113. Mak V, Zielinski J, Tsui LC et al. Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. *JAMA* 1999;6:2217-2224
114. Cohen JA, Friedman KJ, Noone PG et al. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Eng J Med* 1998;339:653-658
115. Shaker N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Eng J Med* 1998;339:645-652
116. Wang XJ, Moylan B, Leopold DA et al. Chronic sino sinusitis in CF heterozygotes. *Ped Pulmonol* 1999;19:91-92
117. report of a joint World Health Organisation, International Cystic Fibrosis (Mucoviscidosis) Association and European Cystic Fibrosis Thematic Network Meeting, June 2000. Classification of Cystic Fibrosis and Related Disorders. WHO Secretariat, Boulyjenkow, Victor: World Health Organisation, Department of Management of Non-Communicable Diseases, Human genetics Programme, CH 1211, Geneva, Switzerland
118. Duddy RM, Scanlin TF. Abnormal sweat electrolytes in a case of celiac disease and a case of psychosocial failure to thrive. *Clin Pediatrics* 1987;26:83-89
119. Alton EW, Hay JG, Muncro C et al. Measurement of nasal potential difference in adult cystic fibrosis, Young's syndrome and bronchiectasis. *Thorax* 1987;42:815-817
120. Delmarco A, Pradal U, Cabrini G, Ionizzato A, Mastella G. Nasal potential difference in cystic fibrosis patients presenting borderline sweat test. *Eur Respir J* 1997;10:1145-1149
121. Hodson ME, Beldon I, Power R, Duncan FR, Banber M, Batten JC. Sweat tests to diagnose cystic fibrosis in adults. *Br Med J* 1983;286:1381-1383
122. Eddie Legg, Department of Clinical Chemistry, Heartlands Hospital, Birmingham. West Midlands Audit 1995, unpublished
123. LeGrys VA. Assessment od Sweat-Testing Practices for the Diagnosis of Cystic Fibrosis. *Arch Path & Lab Med* 2001; 125(11):1420-1424

## PROCESSO DI SVILUPPO DELLE LINEE GUIDA

Il gruppo di lavoro si è costituito nell'Ottobre del 2000 e si è incontrato in 6 occasioni tra il 2000 e il 2002. Il processo di sviluppo delle linee guida intrapreso dal gruppo di lavoro è riassunto in Fig.1.

### CLASSIFICAZIONE DELLE EVIDENZE E DELLE RACCOMANDAZIONI

Il gruppo di lavoro ha intrapreso una revisione sistematica delle evidenze in accordo con la metodologia SIGN e le evidenze e le raccomandazioni sono state classificate in base a questa<sup>(i)</sup>. Il gruppo di lavoro prese atto dell'aggiornamento del sistema di classificazione SIGN<sup>(ii,iii)</sup> avvenuto durante la stesura della linee guida. Il gruppo di lavoro pensò che la versione aggiornata non avrebbe offerto alcun vantaggio, così, dopo consultazione del Royal College of Paediatrics and Child Health, decise di usare la versione originale.

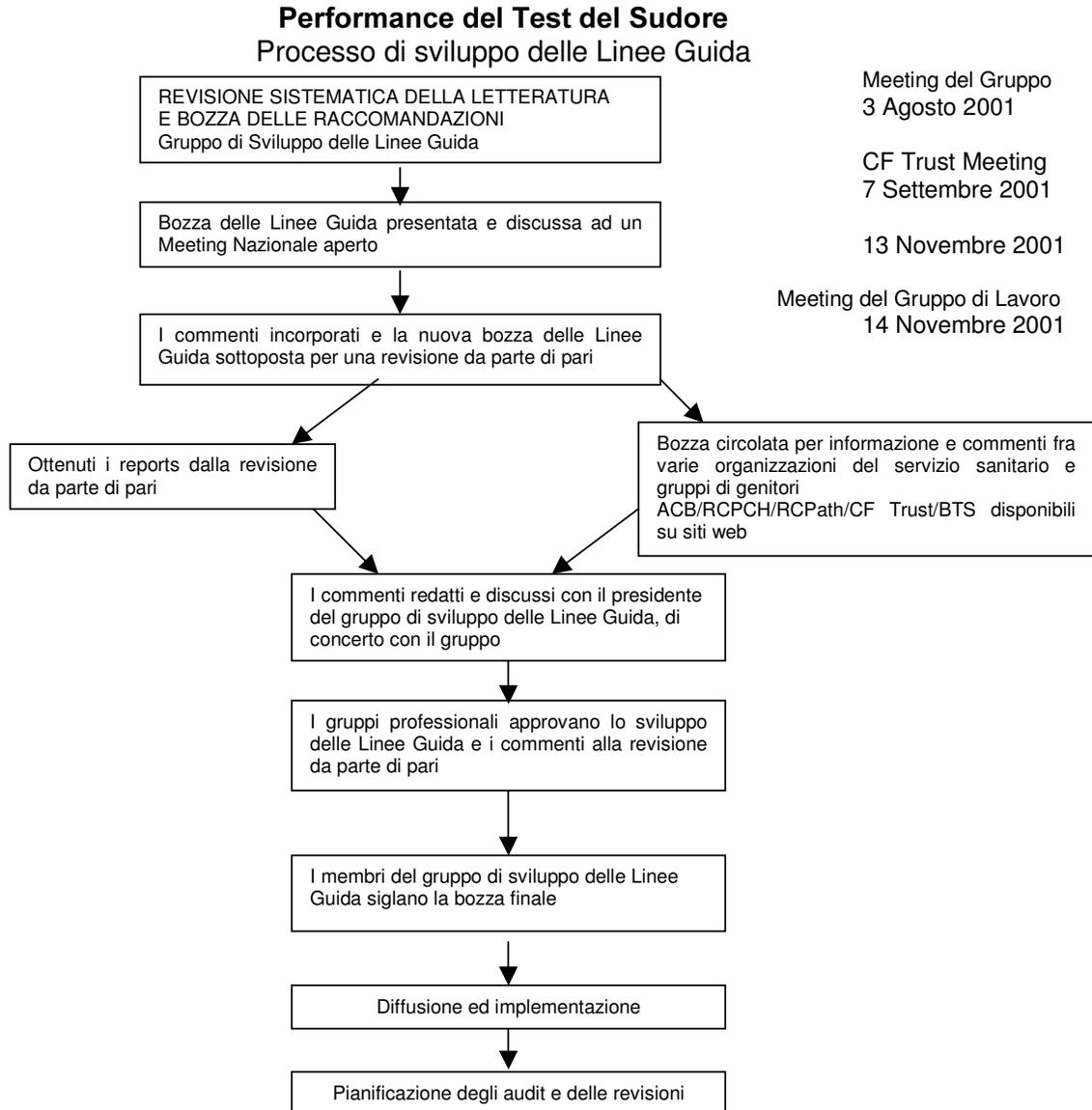
Il gruppo di lavoro pensò che i criteri SIGN, particolarmente IIb e III, fossero talvolta difficili da interpretare nel contesto della performance di un test diagnostico di laboratorio. Il gruppo di lavoro ha così interpretato questi livelli come segue:

<b>Livello dell'evidenza</b>	<b>Classificazione dell'evidenza</b>
<b>IIb</b>	- uno studio scientifico pianificato con ipotesi - uno studio non controllato - uno studio sperimentale con un basso rischio di inaccuratezza
<b>III</b>	- studio osservazionale/non sperimentale - indagine di una procedura standard

Ulteriori punti da considerare sono:

- la pubblicazione non è essenziale per essere considerata buona evidenza
- laddove diverse evidenze si riferiscono allo stesso argomento, è stato assegnato un livello di evidenza globale
- poiché non è etico intraprendere dei trials controllati (randomizzati o meno) per valutare la variabilità nella performance del test del sudore, ci sono pochi dati che possono essere classificati come livello di evidenza I o II
- la formulazione delle raccomandazioni è stata raggiunta attraverso il consenso tra i componenti del gruppo di lavoro

Figura 1



## Bibliografia

- i. SIGN Guidelines: An introduction to SIGN methodology for the development of evidence-based clinical guidelines. Scottish Intercollegiate Network (SIGN). SIGN Publication Number 39, July 1999
- ii. Scottish Intercollegiate Network. SIGN 50: a guideline developer's handbook. Edinburgh: SIGN, 2001
- iii. Harbour R, Miller (for Scottish Intercollegiate Guidelines Network Grading Review Group). A new system of grading recommendations in evidence based guidelines. BMJ 2001;323:334-336

## REVISIONE SISTEMATICA

Il processo di ricerca comprende i seguenti step:

- **Ricerca di database computerizzati**

Medline 1965-2001

Studi umani

Bambini 0-18 anni

Tutti i tipi

Revisioni, meta-analisi, ricerche sui test del sudore, editoriali, trial clinici, lettere, ecc.

- **Ricerche manuali**

Testi e review

Rassegna della letteratura esistente da parte di gruppi di esperti

Articoli selezionati antecedenti al 1965

Contatti personali con esperti riconosciuti nazionali ed internazionali – UK, USA, Australia

- **Ricerca specifica**

Per sezioni particolari del report è stata intrapresa una ricerca specifica, come dettagliato di seguito:

Raccolta del sudore

1. articoli pubblicati sul test del sudore e su:

- Iontoforesi
- Bruciature
- Orticaria
- Attrezzatura
- Strumentazione

2. review dei dati raccolti tramite questionario da 30 Centri per i workshop sul test del sudore (Association of Clinical Biochemists National Meeting 1998 e UK National External Quality Assessment Schemes Workshop 1998)

3. Manuali di istruzione della Wescor (sistema di raccolta Webster modello 3500). 1979; sistema di raccolta del sudore Macroduct modello 3600-sys 1983) e sito Web (<http://www.wescor.com>)

4. Dati raccolti tramite ricerche in internet (Association of Clinical Biochemists Mailbase) e contatto personale con colleghi in Inghilterra e USA

5. Informazioni fornite su richiesta dalla Wescor Inc., via Chemlab Scientific Products, Astra House, Christy Close, Southfield Business Park, Laindon, Essex, SS15 6TQ

#### Analisi del sudore

1. Ricerca sul vocabolario Medical Subject Headings (MeSH) di 'Test del sudore'. Non trovata nessuna definizione corrispondente eccetto per:

Sudore

Sudare

Ghiandola del sudore

Test

Ricerca su: iontoforesi, bruciature, orticaria, attrezzatura e forniture.

Usata una combinazione di ricerca MeSH e parola chiave o testo libero

2. Verifiche UK NEQAS del test del sudore

#### Qualità

1. UK Audits sul test del sudore (dati non pubblicati<sup>(46,47,57,122)</sup>)

2. Dati dallo UK NEQAS sul test del sudore<sup>(67)</sup>

- **Rassegna delle Linee Guida di Consenso esistenti**

- NCCLS 2000<sup>(19)</sup>

- Welsh Sweat Standard 1999<sup>(28)</sup>

- **Sottogruppo Nazionale dei Laboratori Inglesi sul Test del Sudore**<sup>(12)</sup>

- questo comprende l'evidenza da un 'Consenso di esperti' scelti nel Sottogruppo Nazionale dei Laboratori Inglesi.

Sotto la presidenza del Dr. J. Kirk il sottogruppo fu composto da: Birmingham Children's Hospital (Dr. A. Green), Edinburgh Royal Hospital for Sick Children (Dr. J. Kirk), Great Ormond Street (Dr. Tony Reynolds), Sheffield Children's Hospital (Dr. J. Bonham), Southend Hospital (Dr. M. Fahie Wilson), UK NEQAS (Mr. Finlay McKenzie). Il gruppo discusse i dati raccolti da un questionario che era circolato in precedenza. I dati furono raccolti dai partecipanti al meeting e anche dal Belfast Sick Children's Hospital (Ms. G. Roberts), Bristol Children's Hospital (Dr. K. Stone), university Hospital, Cardiff (Ms. H. Losty), Glasgow Royal Hospital for Sick Children (Mrs. M. Rae). St. James university Hospital, Leeds (Dr. L. Shapiro), Liverpool Children's Hospital (Dr. D. Isherwood) and Manchester Children's Hospital (Dr. M. Addison). Furono raccolti dati sul sito di campionamento, il numero di campioni, la strumentazione, il tempo di raccolta, la velocità minima di sudorazione, la definizione di limite superiore dell'intervallo di riferimento e di limite inferiore di intervallo FC e la metodologia.

L'evidenza su cui basare le linee guida è stata aggiornata durante il processo di sviluppo delle stesse per tenere conto delle nuove evidenze pubblicate e delle evidenze emerse dal processo in corso di revisione attraverso incontri e consultazioni.

## CONSULTAZIONE E PEER REVIEW

### **i) Forum di discussione**

la prima bozza delle linee guida fu presentata ai Direttori della Cystic Fibrosis Trust (7 Settembre 2001) ad un meeting aperto a tutti i gruppi di professionisti/pazienti il 13 Novembre 2001 (Appendice 3)

I commenti e nuove evidenze emerse da questi meetings furono successivamente presi in considerazione dal gruppo di lavoro ad un meeting tenutosi il 14 Novembre 2001.

### **ii) Web**

La bozza delle linee guida fu pubblicata sui seguenti siti web tra Novembre, Dicembre 2001 e Gennaio 2002:

Association of Clinical Biochemists

Il Royal College of Pathologists informò i membri della disponibilità della linee guida con l'invito a commentarle

UK NEQAS

### **iii) Consultazione**

Le opinioni dei gruppi interessati, non sul gruppo di lavoro, sono state indirizzate durante la circolazione della bozza delle linee guida a:

Wescor Inc.,  
LOGAN  
Utah,  
USA

Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd.,  
45 Rutland Park,  
Botanical Gardens,  
SHEFFIELD,  
S10 2PB

UK NEQAS  
P.O. Box 3909,  
BIRMINGHAM,  
B15 2UE

I commenti emersi durante questo periodo di consultazione furono gestiti dal presidente del gruppo di lavoro in consultazione con i membri del gruppo. Il gruppo di lavoro raggiunse un consenso su ogni commento.

### **iv) Revisori Specialisti Indipendenti**

Le linee guida furono revisionate da un gruppo di esperti indipendenti. I commenti furono trattati dal gruppo di lavoro ad un meeting il 19 Febbraio 2002 e fu raggiunto un consenso. La bozza delle linee guida fu modificata in risposta ai suggerimenti dei revisori.

I revisori erano:

Prof. John Dodge

professore di salute infantile,

	Dipartimento di Salute Infantile, Singleton Hospital, Swansea, SA2 8QA
Miss Monica Goldfinch	Ricercatrice Clinica Dipartimento di Biochimica Clinica, Royal Victoria Infirmary, Newcastle NE1 4LP
Mr. Paul Griffith	Primario Biochimico Wansbeck General Hospital, Ashington, Northumberland
Dr. Margaret Hodson	Medico di Fibrosi Cistica Royal Brompton and Harefield NHS Trust, Sydney Street, London, SW3 6NP
Ms. Helen Losty	Ricercatrice Clinica Dipartimento di Biochimica Medica, University Hospital of Wales, Heath Park, Cardiff, CF4 4XW
Dr. Bryan Stack	Primario Medico Presidente della British Thoracic Society, Gartnavel General Hospital, 1053 Great Western Road, Glasgow, G12 0YN
Dr, Maurice Super	Primario Genetista Pediatrico, Unità Genetica Pediatrica, Royal Manchester Children's Hospital, Hospital Road, Pendlebury, Manchester M27 4HA

## **Esempio di foglio informativo sul test del sudore per i pazienti/genitori**

Questo foglio è stato elaborato per fornire informazioni agli utenti cui è stato consigliato di eseguire (cui è stato prescritto) un test del sudore. Inoltre, qui ti spieghiamo come raggiungere il dipartimento dove si eseguono i test del sudore, cosa possono significare i risultati del test e le modalità di ritiro dei risultati del test.

---

### ***Cosa è il test del sudore?***

Il test del sudore serve a misurare la quantità di sale (usualmente come cloro) che c'è nel sudore.

---

### ***Perché si esegue?***

Il test viene eseguito su bambini o adulti che hanno infezioni polmonari ricorrenti, quelli che hanno frequenti e inspiegabili feci pallide, quelli che hanno problemi di crescita o quelli risultati positivi al programma di screening neonatale. Ci sono anche altre indicazioni meno frequenti per il test del sudore. Un risultato positivo può significare che tu o il tuo bambino potete essere affetti da FC, ma la diagnosi finale dovrà tenere conto oltre che dei risultati del test, di altri sintomi e dati clinici. Le persone affette da FC hanno un alto contenuto di sale nel loro sudore. Un risultato normale del test può essere utile ad escludere la diagnosi di FC. È importante diagnosticare questa condizione il più precocemente possibile al fine di instaurare il trattamento più idoneo.

---

### ***Chi esegue il test?***

(inserire i dati relativi al servizio offerto).

---

### ***Il test è doloroso?***

Alcune persone provano una sensazione di prurito nella sede del braccio o della gamba dove il sudore viene raccolto. Nessun ago da iniezione viene impiegato.

---

### ***In cosa consiste il test?***

Si posizionano sull'avambraccio o sulla gamba speciali tamponi imbevuti di una sostanza chimica chiamata Pilocarpina che stimola la produzione del sudore. Questi tamponi vengono fissati in posizione ed un piccolo flusso di corrente da un generatore a batteria attraversa i tamponi per stimolare ulteriormente il processo di produzione del sudore. Il test non è doloroso, sebbene si possa avvertire una piccola sensazione di prurito. I tamponi vengono lasciati in sede per ca. 5 minuti, quindi vengono rimossi. Nella zona dove la pilocarpina ha stimolato la produzione del sudore dovrebbe esserci la cute arrossata. Questo è un fenomeno transitorio, tipico della stimolazione con pilocarpina, che si attenua nel giro di poche ore. La cute viene allora lavata accuratamente con acqua purificata e asciugata. Un pezzo di carta da filtro, talvolta un orologio con spirale, viene posizionato e assicurato sulla zona stimolata. Ti verrà allora chiesto di attendere per 30 minuti finché il sudore non viene assorbito dalla carta da filtro o dal dispositivo a spirale. Durante questi 30 minuti tu (o il tuo bambino) siete liberi di leggere, giocare, o mangiare, sebbene i cibi salati come le patatine fritte dovrebbero essere evitate per minimizzare qualsiasi rischio di contaminazione. La carta da filtro o la spirale viene quindi rimossa dall'operatore e inviata al laboratorio per l'analisi del sudore.

---

### ***I risultati***

Nella maggior parte dei casi i risultati mostrano molto chiaramente o un livello elevato (anormale) o normale di sale nel sudore. Talvolta i risultati possono avere un significato dubbio e il test deve essere ripetuto. In pochi casi il test può avere necessità di essere ripetuto per ragioni tecniche, quali ad esempio una scarsa quantità di sudore raccolto.

Molti medici preferiscono confermare un test del sudore anormale con un secondo test del sudore.

---

***Quanto tempo passa prima di ricevere i risultati del test?***

(inserire i dati relativi al servizio offerto).

---

***Chi mi informa dei risultati del test?***

(inserire i dati relativi al servizio offerto).

---

***Altre domande***

Se hai domande relative all'esecuzione del test, cortesemente contattare.....

Se hai altre domande relative alla prescrizione del test del sudore nel tuo caso (o in quello di tuo figlio/a) parlane con il medico di famiglia/specialista che ti ha consigliato di eseguire questo test così che possa fornirti ulteriori informazioni.

## APPENDICE 2a

### **PROCEDURA DEL TEST DEL SUDORE WESCOR MACRODUCT**

#### **Raccolta del sudore**

##### **INTRODUZIONE:**

La fibrosi cistica è la malattia genetica più comune e seria nella razza caucasica con un'incidenza in Inghilterra di ca. 1 affetto su 2500 nati vivi. Il difetto primario riguarda un difetto nel trasporto di ioni cloro attraverso le membrane cellulari che genera secrezioni esocrine molto vischiose. I sintomi principali sono la scarsa crescita, infezioni respiratorie ricorrenti e insufficienza pancreatica che determina malassorbimento dei nutrienti. L'aumentata secrezione di cloro (ed in minor grado di altri ioni) nel sudore è alla base del test diagnostico per questa condizione.

##### **PRINCIPIO:**

La pilocarpina stimola, con la iontoforesi, la secrezione di sudore in una piccola area cutanea dell'avambraccio. Il sudore stimolato, prodotto in questa area, viene raccolto direttamente nel Macroduct per l'analisi del cloro.

##### *SOSTANZE PERICOLOSE E TIPO DI PERICOLO:*

RIFERIRSI ALLE LINEE GUIDA COSHH DI LABORATORIO PER CIASCUNA

Pilocarpina	<b>TOSSICA</b>
Sudore	<b>RISCHIO BIOLOGICO</b>
Contatto cute-elettrodo	<b>BRUCIATURA</b>

##### **PRECAUZIONI:**

Lavare le mani prima e dopo la procedura.

In caso di contatto della pilocarpina con occhi, bocca o vaste aree cutanee, lavare con abbondanti quantità d'acqua.

Verificare gli elettrodi prima di ogni test. Sostituirli se mostrano perforazioni o deformazioni. Non usare i dischi di Pilogel oltre la data di scadenza, frantumati o che mostrano altri segni di deterioramento. Mai lasciare il paziente durante la iontoforesi e indagare ogni eventuale "bruciatura" o "puntura". Al termine del test, l'area di cute stimolata dovrebbe apparire rossa. Se si evidenziano segni di bolle e bruciature cercare l'assistenza medica.

##### **CONDIZIONI DEL PAZIENTE E DEL CAMPIONE:**

Risultati affidabili del test del sudore si ottengono quando il test viene eseguito con la massima cura da parte di un operatore esperto. SOLO lo staff che è stato addestrato all'uso del sistema Wescor dovrebbe eseguire questo test.

Il test del sudore dovrebbe essere rimandato nei neonati con meno di 7gg di età e/o un peso <3 Kg, soggetti disidratati, con malattie sistemiche o che hanno eczema marcato o edema. I test del sudore non dovrebbero essere eseguiti in soggetti in ossigeno-terapia con dispositivi aperti (ad eccezione di mascherine e cannule nasali).

### **CARATTERISTICHE DELLO STRUMENTO:**

1. Sistema di raccolta del sudore Wescor (Modello 3600, 3700, ecc.).  
Verificare i seguenti componenti:
  - a) Generatore (anche la base di ricarica e il trasformatore se si usa il modello 3600)
  - b) 2 elettrodi per iontoforesi (rosso e nero), ciascuno con fascia in velcro
  - c) fasce in velcro regolabili per fissare in posizione il Macroduct
  - d) carta da filtro o garza, forbici e pinzette
2. contenitori o provette sigillabili per il trasporto e la conservazione del sudore (Es: coppette e tappi per Autoanalyser, tubi capillari per ematocrito da 100uL e plastilina)
3. tamponi
4. garze mediche o batuffoli di cotone
5. etichette adesive per l'identificazione del campione

### **REAGENTI:**

1. *Macroduct Test Kit*. Chemlab Cat no WE55032 (12 dischi di Pilogel e 6 dispositivi per la raccolta). Conservare secondo le istruzioni del produttore.
2. *Acqua distillata o deionizzata in bottiglie per lavaggi* (spruzzette)

### **PROCEDURA:**

1. Verificare visivamente le condizioni del generatore, delle connessioni e degli elettrodi. Eseguire ogni operazione di manutenzione ordinaria descritta nel Manuale dello strumento.
2. Illustrare la procedura al paziente/genitori. In base alle procedure locali, questo può includere la consegna di un'informativa scritta al paziente. I pazienti possono già aver ricevuto questa informativa quando hanno fissato l'appuntamento per il test.
3. Versare acqua distillata o deionizzata nella spruzzetta e impregnare i batuffoli di cotone.
4. Chiedere al paziente/genitore di rimuovere gli indumenti per scoprire l'avambraccio, o altre sedi dove eseguire in alternativa il test. Si possono usare entrambe le braccia.
5. Selezionare la zona per la iontoforesi. La superficie interna dell'avambraccio è quasi sempre il sito prescelto. Si possono usare entrambe le braccia. La cute dovrebbe essere glabra, non raggrinzita, non lesionata o irritata. Nei bambini molto piccoli, con una superficie dell'avambraccio insufficiente, si possono usare come siti di raccolta, la parte alta del braccio, o l'esterno della coscia.
6. Tamponare l'area selezionata con un tampone, poi con un batuffolo di cotone intriso di acqua deionizzata o distillata. Asciugare con un tessuto pulito.
7. Inumidire la cute con un panno fresco imbevuto di acqua distillata o deionizzata per assicurare un buon flusso di corrente.
8. Posizionare su ciascun elettrodo un disco di gel con pilocarpina e ruotare il disco per assicurare un buon contatto.
9. Fissare i due elettrodi in posizione. La raccolta del sudore avverrà all'elettrodo rosso (positivo). Selezionare quest'area per avere il miglior contatto possibile tra

- cute e superficie dell'elettrodo (cioè il più lontano possibile dal polso, nell'area con il miglior tessuto sottocutaneo). Assicurarsi che gli elettrodi siano distanti almeno 2 cm l'uno dall'altro, in modo da prevenire il fenomeno del *bridging*. Se necessario, l'elettrodo negativo può essere posizionato sulla superficie esterna dell'avambraccio o sulla parte alta del braccio.
10. Sebbene il principio sia lo stesso per tutte le versioni del generatore Wescor, i dettagli possono leggermente variare. Le istruzioni fornite dal costruttore dovrebbero essere seguite in tutti i casi.
    - Esempio per il SISTEMA 3600:
      - a. connettere l'unità 3600 alla base di ricarica. Connettere il trasformatore all'unità e al generatore. Attendere che la spia verde si accenda.
      - b. disconnettere l'unità 3600 dalla base di ricarica. Connettere gli elettrodi all'unità 3600 e premere il pulsante START. "In process" si illumina immediatamente e la spia del flusso di corrente si accende debolmente all'inizio.
      - c. Se suona l'allarme sonoro:
        - i. si è verificato un blocco nel circuito o
        - ii. il generatore non è stato adeguatamente caricatoIn entrambe i casi eseguire le seguenti operazioni.  
Ricaricare il generatore (il cicalino si spegnerà non appena il generatore verrà collegato al caricatore).  
Verificare gli attacchi degli elettrodi.
      - d. Al termine della iontoforesi 'chirrup' suonerà brevemente e la spia "In Process" si spegnerà.
  11. Rimuovere gli elettrodi dal braccio. Di solito l'area stimolata è visibilmente rosa o rossa. Tamponare l'area sotto l'elettrodo rosso (positivo) a fondo usando garze imbevute di acqua distillata o deionizzata. Ripetere l'operazione almeno 3 volte, quindi asciugare l'area con garza.
  12. Aprire la confezione che contiene il sistema Macroduct. Tenendo la superficie coperta con politene, infilarvi la fascia in velcro (volgere la superficie pelosa verso l'esterno)
  13. Immediatamente fissare il dispositivo Macroduct in posizione sul braccio del paziente, sopra l'area stimolata. Fare attenzione a non pizzicare la cute quando si stringe la fascia. Per i bambini piccoli o altri individui che possono disturbare la fase di raccolta del sudore, assicurare il dispositivo Macroduct in posizione con bendaggio elastico.
  14. Srotolare la manica del bambino e lasciare il dispositivo Macroduct in posizione per 20 minuti. Può essere lasciato in posizione più a lungo se la quantità di sudore raccolta è insufficiente (meno di 2 giri di spirale = 15uL) dopo 20 minuti, ma non dovrebbe essere mai lasciato più a lungo di 30 minuti. Sebbene suggerito nel manuale d'istruzione del costruttore (1), estendere il tempo di raccolta oltre i 30 minuti non aumenta in modo significativo la quantità di sudore.
  15. Etichettare la provetta con i dati identificativi del paziente.
  16. Lasciando il dispositivo Macroduct in posizione sul braccio, rimuovere il coperchio in perspex. Attaccare il sistema di estrazione (estremità bianca) all'estremità esterna della spirale e srotolare. Non comprimere il tubo della spirale, poiché questo può causare perdita di sudore. Tagliare il tubo il più vicino possibile al Macroduct. Posizionare l'estremità tagliata del tubo nella coppetta Autoanalyzer,

quindi premere lo stantuffo della siringa di estrazione per trasferire il sudore, evitando bolle d'aria. Rimuovere la siringa per estrazione dal liquido prima di rilasciare la pressione nel tubo. Tappare la coppetta e conservare in posizione diritta.

17. Il volume minimo di sudore accettabile, corrispondente a  $1\text{gr}/\text{m}^2/\text{min}$  è di 12uL o mg per un periodo di raccolta di 20 minuti, o 18uL o mg per un periodo di raccolta di 30 minuti (vd. § 4.1.3 Linee Guida). Questa verifica può essere fatta usando l'apposito inserto fornito insieme al Macroduct. La pesata non è necessaria, ma se si preferisce pesare, bisogna trasferire il sudore raccolto in una coppetta prepesata e opportunamente identificata, quindi ripesarla immediatamente dopo avervi trasferito il sudore. Verificare l'adeguatezza dei campioni di sudore subito dopo la raccolta del sudore. Quantità di sudore inferiori a 12uL o mg in 20 minuti, o 18uL o mg in 30 minuti, non dovrebbero essere analizzate. Il tempo impiegato per raccogliere il sudore dovrebbe essere tenuto in considerazione quando si verifica l'idoneità di un campione di sudore. Se si estende il tempo di raccolta nel tentativo di aumentare la resa, si deve tenere conto che la quantità minima di sudore aumenta. Dal momento che la quantità di sudore prodotta cade rapidamente dopo 30 minuti, una resa scarsa a 30 minuti è altamente improbabile che raggiunga una quantità idonea estendendo il periodo di raccolta oltre i 30 minuti. Le quantità di sudore insufficienti non dovrebbero essere sommate a raccolte successive per raggiungere un volume sufficiente. Il test del sudore dovrebbe essere ripetuto da capo.
18. Se l'analisi non viene eseguita immediatamente, o se il campione deve essere trasportato in un altro luogo per l'analisi, si raccomanda di trasferire il sudore in un tubo capillare aperto di vetro identificato. Lasciare un vuoto d'aria ad entrambe le estremità che vengono poi sigillate con plastilina.

Analisi del sudore

#### **PRINCIPIO:**

Il sudore prodotto viene direttamente raccolto in un Macroduct e analizzato per il cloro (anche il sodio e la conduttività possono essere misurate). Il cloro nel sudore può essere dosato con metodo colorimetrico, coulometrico o con elettrodo selettivo.

#### **SOSTANZE PERICOLOSE E NATURA DEL PERICOLO:**

sudore umano  
sostanze chimiche

**rischio biologico**  
**vd. metodo in uso**

#### **PRECAUZIONI:**

Evitare la contaminazione o l'evaporazione del campione di sudore.

#### **REQUISITI DEL CAMPIONE:**

Appena giunto in laboratorio, sottoporre il campione immediatamente all'analisi o trasferire in capillari di vetro da 100uL (o altri contenitori sigillabili di opportuna grandezza). Sigillare le estremità del capillare con plastilina e riportare sul contenitore i dati identificativi univoci del paziente. Conservare fino a 6 ore prima dell'analisi.

## **STRUMENTAZIONE:**

Appropriata alla metodologia d'analisi. Vd. procedura a parte per l'analisi e le operazioni di manutenzione.

## **REAGENTI:**

Appropriati alla metodologia d'analisi. Vd. procedura a parte.

## **CALIBRATORI:**

Il metodo d'analisi dovrebbe essere calibrato usando reattivi commerciali o fatti in casa a concentrazioni appropriate per l'analisi di campioni di sudore, cioè tra 0 e 150 mmol/L.

La linearità e la sensibilità del metodo deve essere determinata per stabilire il suo range di lavoro. Il limite di rilevazione dovrebbe essere determinato per ciascun analita misurato; non dovrebbe essere maggiore di 10 mmol/L.

## **CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO:**

Dovrebbero essere analizzate in ciascun batch di campioni di sudore 2 concentrazioni di controllo di qualità interno. Una concentrazione dovrebbe essere entro il range di normalità, l'altra nel range intermedio o patologico. Questi materiali possono essere commerciali o fatti in casa.

## **PROCEDURA:**

1. Prelevare il sudore direttamente dalla coppetta o, rompendo attentamente le estremità del capillare in vetro, prelevare la quantità di sudore per l'analisi; conservare il sudore rimasto nel capillare, sigillare le estremità.
2. Preparare in duplicato i campioni di sudore e i materiali di controllo da analizzare. Questa operazione deve includere ogni operazione di pre-diluizione del campione di sudore.
3. Analizzare i materiali di controllo e i campioni di sudore. Ogni risultato che esce dal range analitico del metodo in uso deve essere ripetuta con un'opportuna diluizione.

## **CALCOLO:**

Calcolare la concentrazione di cloro nel sudore, tenendo conto di ciascun fattore di diluizione.

Tutte le operazioni di calcolo devono essere verificate in modo indipendente.

## **VERIFICA DEL CONTROLLO DI QUALITA':**

I risultati sui materiali di controllo devono essere dentro limiti definiti da centro a centro.

I metodi in uso dovrebbero essere in grado di produrre un CV tra batch <5%. Limiti accettabili per i materiali di controllo dovrebbero riflettere questo dato.

## REFERTO:

Il referto tipo dovrebbe riportare:

- iii. l'identificazione completa del paziente
- iv. la data e l'ora del test e la data e l'ora del referto
- v. il peso/volume del sudore raccolto e il minimo peso/volume di sudore accettabile definito in base a parametri localmente definiti. Questa quantità/volume si deve dimostrare equivalente a una velocità media di produzione del sudore di  $1\text{gr/m}^2/\text{min}$  nel periodo di raccolta
- vi. i risultati analitici (cloro, conduttività, sodio) devono essere espressi in mmol/L. Si dovrebbe riportare in modo esplicito quale analita/i è/sono stato/i misurato/i
- vii. gli intervalli di riferimento, cioè
  - una  $[\text{Cl}^-] > 60$  mmol/L supporta la diagnosi di FC
  - una  $[\text{Cl}^-]$  intermedia, compresa tra 40 e 60 mmol/L è suggestiva, ma non diagnostica per FC
  - una  $[\text{Cl}^-] < 40$  mmol/L è normale e c'è una bassa probabilità per FC
  - il risultato del sodio non dovrebbe essere interpretato senza un risultato del cloro. Il sodio non aggiunge nulla all'interpretazione del cloro nei casi chiaramente normali o patologici, ma può occasionalmente essere utile nell'interpretazione dei valori di cloro intermedi
  - mancando ulteriori dati sulle misure conduttivimetriche, un valore  $< 60$  mmol/L di equivalenti di NaCl è improbabile che sia associato con la FC. Valori oltre 90 mmol/L supportano la diagnosi di FC
- viii. l'interpretazione dei risultati, basata sugli intervalli di riferimento sovra esposti, e ogni ulteriore informazione aggiuntiva sul paziente (ES: sufficienza pancreatica, mutazioni FC rare, ecc.)
- ix. le raccomandazioni nel caso si debba ripetere il test per le seguenti cause:
  - il paziente non può essere stimolato
  - la quantità di sudore raccolta è scarsa
  - il primo test ha fornito risultati patologici o borderline
  - i risultati non sono fisiologici, cioè cloro o sodio  $> 150$  mmol/L, conduttività  $> 170$  mmol/L, scarto tra valori di sodio e cloro  $> 20$  mmol/L

## BIBLIOGRAFIA:

1. Instruction Manual – Macroduct Sweat Collection System (secondo il modello in uso)
2. Medical Device Agency. Safety Notice. MDA SN1999(05)
3. Guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of Cystic Fibrosis in the UK

## APPENDICE 2b

### PROCEDURA DEL TEST DEL SUDORE

#### RACCOLTA SU CARTA DA FILTRO SECONDO GIBSON E COOKE

Raccolta del sudore

#### INTRODUZIONE:

La fibrosi cistica è la malattia genetica più comune e seria nella razza caucasica con un'incidenza in Inghilterra di ca. 1 affetto su 2500 nati vivi. Il difetto primario riguarda un difetto nel trasporto di ioni cloro attraverso le membrane cellulari che genera secrezioni esocrine molto vischiose. I sintomi principali sono la scarsa crescita, infezioni respiratorie ricorrenti e insufficienza pancreatica che determina malassorbimento dei nutrienti. L'aumentata secrezione di cloro (ed in minor grado di altri ioni) nel sudore è alla base del test diagnostico per questa condizione.

#### PRINCIPIO:

La pilocarpina viene rilasciata, tramite iontoforesi, ad una piccola area di ghiandole sudoripare nell'avambraccio. Il sudore generato dalla stimolazione in questa area viene raccolto su carta da filtro per l'analisi del cloro.

#### SOSTANZE PERICOLOSE E NATURA DEL PERICOLO:

RIFERIRSI ALLE LINEE GUIDA COSHH DI LABORATORIO PER CIASCUNA

pilocarpina  
elettroliti al catodo  
sudore  
contatto con l'elettrodo

**TOSSICA**  
**POTENZIALMENTE TOSSICI**  
**RISCHIO BIOLOGICO**  
**BRUCIATURE**

#### PRECAUZIONI:

Lavare le mani prima e dopo la procedura. In caso di contatto della pilocarpina o degli elettroliti al catodo con occhi, bocca o vaste aree cutanee, lavare con abbondante acqua. Verificare gli elettrodi prima di ogni test. Sostituirli se compaiono segni di forature o deformazioni. Non sciare mai il paziente durante la iontoforesi. Aumentare e ridurre gradualmente la corrente e indagare ogni eventuale bruciatura o puntura. Al termine del test, l'area di cute stimolata dovrebbe apparire rossa. Se si evidenziano segni di bolle e bruciature cercare l'assistenza medica.

#### CONDIZIONI DEL PAZIENTE E DEL CAMPIONE:

Risultati affidabili del test del sudore si ottengono quando il test viene eseguito con la massima cura da parte di un operatore esperto. SOLO lo staff che è stato addestrato all'uso del sistema Wescor dovrebbe eseguire questo test.

Il test del sudore dovrebbe essere rimandato nei neonati con meno di 7gg di età e/o con peso <3 Kg, soggetti disidratati, con malattie sistemiche o che hanno eczema marcato o edema. I test del sudore non dovrebbero essere eseguiti in soggetti in ossigeno-terapia con dispositivi aperti (ad eccezione di mascherine e cannule nasali).

#### **CARATTERISTICHE DELLO STRUMENTO:**

1. Carta da filtro senza cloro e sodio (Es: Whatman No 41/42/44/541) con dimensioni simili ai supporti per gli elettroliti
2. Contenitori a tenuta stagna per pesare ed eluire la carta d filtro (Es: contenitori universali da laboratorio)
3. Generatore di corrente per iontoforesi (Es: C & IS Electronics Gibson – Cooke Power Supply)
4. 2 elettrodi
5. Fasce per elettrodi in velcro o in gomma regolabili
6. Tamponi di supporto per elettroliti (Es: Hospital Lint BPC Plain 500gr ripiegata 4-8 volte (spessore >1 cm). Il tampone dovrebbe essere almeno 1 cm più largo dell'elettrodo in tutte le direzioni per prevenire il contatto dell'elettrodo con la cute. Può essere inserito in tasche cucite che possono contenere l'elettrodo e prevenire il contatto con la cute.
7. Tamponi
8. Batuffoli di cotone
9. Fazzoletti di carta o di tessuto
10. Contenitori per acqua distillata o deionizzata per lavare (Es: Traysin)
11. 2 contenitori adatti per impregnare di soluzione di elettroliti i tamponi (Es: Gallipots)
12. Pinzette in plastica
13. Foglietti di materiale impermeabile almeno 1 cm più larghi in tutte le direzioni dei foglietti di carta da filtro (Es: politene o parafilm)
14. Pellicola di plastica trasparente (Es. Domopack)

#### **REAGENTI:**

1. *Soluzione di nitrato di pilocarpina (0.2 – 0.5%). Categoria farmaceutica.*
2. *Elettroliti al catodo, se diversi (Es: solfato di magnesio). Categoria farmaceutica.*
3. *Acqua distillata o deionizzata*

#### **PROCEDURA:**

1. Verificare visivamente le condizioni del generatore, delle connessioni e degli elettrodi. Eseguire ogni operazione di manutenzione ordinaria descritta nel Manuale dello strumento.
2. Marcare il contenitore che deve essere usato. Usando le pinzette, inserire nel contenitore un foglietto di carta da filtro. Azzerare la bilancia e registrare il peso del contenitore con carta da filtro con 4 cifre decimali.
3. Trasportare il contenitore e la carta da filtro in una busta di politene.
4. Mettere nel contenitore con soluzione di elettroliti il tampone; aggiungere la soluzione di pilocarpina per saturare il tampone.
5. Mettere in un secondo contenitore un tampone; aggiungere la soluzione di pilocarpina o altra soluzione di elettroliti per saturare il tampone.

6. Illustrare la procedura al paziente/genitori. In base alle procedure locali, questo può includere la consegna di un'informativa scritta al paziente. I pazienti possono già aver ricevuto questa informativa quando hanno fissato l'appuntamento per il test.
7. Versare acqua distillata o deionizzata nella spruzzetta e impregnare i batuffoli di cotone.
8. Chiedere al paziente/genitore di rimuovere gli indumenti per scoprire l'avambraccio, o altre sedi dove eseguire in alternativa il test. Si possono usare entrambe le braccia.
9. Selezionare la zona per la iontoforesi. La superficie interna dell'avambraccio è quasi sempre il sito prescelto. La cute dovrebbe essere glabra, non raggrinzita, non lesionata o irritata. Nei bambini molto piccoli, con una superficie dell'avambraccio insufficiente, si possono usare come siti di raccolta, la parte alta del braccio, o l'esterno della coscia.
10. Tamponare l'area selezionata con un tampone, poi con un batuffolo di cotone intriso di acqua deionizzata o distillata. Asciugare con un tessuto pulito.
11. Inumidire la cute con un panno fresco imbevuto di acqua distillata o deionizzata per assicurare un buon flusso di corrente.
12. Posizionare sull'elettrodo rosso (positivo) il tampone intriso di pilocarpina e fissare bene in sede l'elettrodo con la fascia. Poiché la raccolta di sudore avverrà in questa sede, scegliere la superficie dell'avambraccio migliore possibile (cioè il più lontano possibile dal polso, nell'area con il miglior tessuto sottocutaneo).
13. Posizionare sull'elettrodo nero (negativo) il tampone intriso di pilocarpina o solfato di magnesio e fissare con la fascia l'elettrodo in sede.
14. Assicurarsi che gli elettrodi siano sufficientemente distanti l'uno dall'altro, in modo da prevenire il fenomeno del *bridging*. Asciugare la cute tra i due elettrodi con tessuto. Se necessario, l'elettrodo negativo può essere posizionato sulla superficie esterna dell'avambraccio o sulla parte alta del braccio.
15. Verificare la posizione di entrambi gli elettrodi e dei rispettivi tamponi e che ci sia un margine sufficiente di tampone ben saturato intorno agli elettrodi per prevenire il contatto cute-elettrodo.
16. Connettere gli elettrodi al generatore: l'elettrodo positivo (rosso) è quello con la soluzione di pilocarpina; l'elettrodo negativo (nero) è l'elettrodo con la soluzione di pilocarpina o soluzione di elettroliti alternativa.
17. Accendere il generatore e settare la corrente a 0.5 mA
18. Lentamente (in 10-15 secondi) aumentare la corrente fino a 4 mA. Durata stimolazione: 5 minuti. A causa dell'elevata resistenza della cute alcuni pazienti, spesso adulti, possono, molto occasionalmente, far scattare il salvavita del blocco alimentatore a una corrente <4 mA. Se ciò avviene, verificare tutte le connessioni e risistemare gli elettrodi e i tamponi. Se il problema si ripresenta, annotare la corrente a cui si innesca il salvavita e eseguire la iontoforesi a una corrente appena al di sotto di questo punto.
19. Dopo 5 minuti, lentamente (in 10-15 secondi) ridurre la corrente e spegnere.
20. Rimuovere gli elettrodi e i tamponi dal braccio. Di solito l'area di cute stimolata è visibilmente rosa o rossa. Tamponare a fondo l'area sotto l'elettrodo rosso (positivo) usando tessuti imbevuti di acqua distillata. Eseguire questa operazione almeno 3 volte, quindi asciugare con tessuto.
21. Rimuovere la carta da filtro dal contenitore usando pinzette sterili e posizionarla sull'area stimolata.
22. Coprire immediatamente con parafilm o politene e sigillare con nastro adesivo tutt'intorno al parafilm. Evitare di toccare la superficie interna del foglietto di parafilm o politene.

23. Rivestire il paziente e attendere 30 minuti. Estendere il tempo di raccolta oltre i 30 minuti non aumenta il peso del sudore raccolto di una quantità significativa.
24. Strofinare la superficie esterna del parafilm per trasferire tutto il sudore condensato sulla carta da filtro. Rimuovere il parafilm facendo molta attenzione e con pinzette sterili trasferire la carta da filtro nel contenitore da cui era stata estratta e che era stato già pesato.
25. Chiudere il contenitore molto bene. Trasportare il contenitore in borse di politene. Ripesare il contenitore con la stessa bilancia a 4 cifre decimali con cui era stata effettuata la prima pesata.
26. Verificare l'idoneità dei campioni immediatamente dopo la raccolta. Calcolare la quantità minima accettabile di sudore, corrispondente ad una velocità media di sudorazione di 1gr/m<sup>2</sup>/min, come segue (vd. § 4.1.3 delle Linee Guida):

Calcolare l'area della carta da filtro utilizzata per raccogliere il sudore in cm<sup>2</sup> come  $\pi r^2$ , dove r è il raggio.

La velocità media di sudorazione (gr/m<sup>2</sup>/min) è:

$$\frac{10000}{\text{area (cm}^2\text{)}} \times \frac{\text{peso del sudore (mg o uL)}}{1000} \times \frac{1}{\text{tempo di raccolta (min)}} = \frac{10 \times \text{peso del sudore (mg o uL)}}{\text{area (cm}^2\text{)} \times \text{tempo di raccolta (min)}}$$

Es: per una raccolta di sudore su dischi di carta da filtro del  $\varnothing$  di 5.5 cm ad una velocità di 1gr/m<sup>2</sup>/min, devo ottenere una quantità di sudore di 71 mg

Quantità di sudore al di sotto di 1gr/m<sup>2</sup>/min non dovrebbero essere analizzate. Il tempo impiegato per raccogliere il sudore dovrebbero essere tenuto in considerazione quando si verifica l'idoneità di un campione di sudore. Se si estende il tempo di raccolta nel tentativo di aumentare la resa, si deve tenere conto che la quantità minima di sudore aumenta. Dal momento che la quantità di sudore prodotta cade rapidamente dopo 30 minuti, una resa scarsa a 30 minuti è altamente improbabile che raggiunga una quantità idonea estendendo il periodo di raccolta oltre i 30 minuti. Le quantità di sudore insufficienti non dovrebbero essere sommate a raccolte successive per raggiungere un volume sufficiente. Il test del sudore dovrebbe essere ripetuto da capo.

Analisi del sudore

#### **PRINCIPIO:**

Il sudore prodotto viene eluito dalla carta da filtro in un opportuno eluente e analizzato per il cloro (anche il sodio può essere misurato). Il cloro nel sudore può essere dosato con metodi colorimetrico, coulometrico o con elettrodo selettivo.

#### **SOSTANZE PERICOLOSE ENATURA DEL PERICOLO:**

sudore umano  
sostanze chimiche

**RISCHIO BIOLOGICO**  
**vd. metodo in uso**

**PRECUAZIONI:**

Evitare la contaminazione o l'evaporazione del campione di sudore.

**REQUISITI DEL CAMPIONE:**

Appena giunto in laboratorio, sottoporre il campione immediatamente all'analisi o conservare i campioni di sudore raccolti su carta da filtro a 2-8°C per un massimo di 3 giorni in contenitori di opportuna grandezza, dove non avvengono evaporazione o perdite di campione. I campioni di sudore possono essere trasportati per l'analisi a questo stadio.

**STRUMENTAZIONE:**

Appropriata alla metodologia d'analisi. Vd. procedura a parte per l'analisi e le operazioni di manutenzione.

**REAGENTI:**

Appropriati alla metodologia d'analisi. Vd. procedura a parte.

**CALIBRATORI:**

Il metodo d'analisi dovrebbe essere calibrato usando reattivi commerciali o fatti in casa a concentrazioni appropriate per l'analisi di campioni di sudore, cioè tra 0 e 150 mmol/L.

La linearità e la sensibilità del metodo devono essere determinate per stabilire il suo range di lavoro. Il limite di rilevazione dovrebbe essere determinato per ciascun analita misurato; non dovrebbe essere maggiore di 10 mmol/L.

**CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO:**

Dovrebbero essere analizzate in ciascun batch di campioni di sudore 2 concentrazioni del controllo di qualità interno. Una concentrazione dovrebbe essere entro il range di normalità, l'altra nel range intermedio o patologico. Questi materiali possono essere commerciali o fatti in casa.

1. Usando le pinzette posizionare all'interno di un contenitore un dischetto di carta da filtro. Azzerare la bilancia e registrare il peso con 4 cifre decimali
2. Pipettare sulla carta da filtro il CQI per raggiungere circa il peso del sudore di un paziente
3. Ripesare il contenitore + carta da filtro + CQI con 4 cifre decimali
4. Trattare i campioni e i controlli in parallelo durante tutta la restante procedura d'analisi

**PROCEDURA:****ELUIZIONE:**

1. Aggiungere il diluente (il volume è metodo dipendente) ad ogni contenitore con carta da filtro e sudore o CQI

2. Chiudere i contenitori ed eluire per un minimo di 40 minuti. Il mescolamento è consentito usando un rotore
3. Centrifugare i contenitori per rimuovere ogni fibra della carta da filtro. Usare il sovrantante per l'analisi

#### **ANALISI:**

1. Preparare in duplicato campioni e materiali di controllo per l'analisi. Questo passaggio deve includere ogni pre-diluizione del campione.
2. Analizzare campioni e controlli. Nel caso qualche risultato esca dal range analitico del metodo, il campione deve essere ritestato con un'opportuna diluizione.

#### **CALCOLO:**

Calcolare la concentrazione di cloro nel sudore e nei materiali di controllo, tenendo conto del peso e dei fattori di diluizione.

Tutte le operazioni di calcolo devono essere verificate in modo indipendente.

#### **VERIFICA DEL CONTROLLO DI QUALITA':**

I risultati sui materiali di controllo devono essere dentro limiti definiti da centro a centro.

I metodi in uso dovrebbero essere in grado di produrre un CV tra batch <5%. Limiti accettabili per i materiali di controllo dovrebbero riflettere questo dato.

#### **REFERTO:**

Il referto tipo dovrebbe riportare:

- vi. l'identificazione completa del paziente
- vii. la data e l'ora del test e la data e l'ora del referto
- viii. il peso/volume del sudore raccolto e il minimo peso/volume di sudore accettabile definito in base a parametri localmente definiti. Questa quantità/volume si deve dimostrare equivalente a una velocità media di produzione del sudore di  $1\text{gr}/\text{m}^2/\text{min}$  nel periodo di raccolta
- ix. i risultati analitici (cloro, conduttività, sodio) devono essere espressi in mmol/L. Si dovrebbe riportare in modo esplicito quale analita/i è/sono stato/i misurato/i
- x. gli intervalli di riferimento, cioè
  - una  $[\text{Cl}^-] > 60\text{ mmol/L}$  supporta la diagnosi di FC
  - una  $[\text{Cl}^-]$  intermedia, compresa tra 40 e 60 mmol/L è suggestiva, ma non diagnostica per FC
  - una  $[\text{Cl}^-] < 40\text{ mmol/L}$  è normale e c'è una bassa probabilità per FC
  - il risultato del sodio non dovrebbe essere interpretato senza un risultato del cloro. Il sodio non aggiunge nulla all'interpretazione del cloro nei casi chiaramente normali o patologici, ma può occasionalmente essere utile nell'interpretazione dei valori di cloro intermedi
- vi. l'interpretazione dei risultati, basata sugli intervalli di riferimento sovra esposti, e ogni ulteriore informazione aggiuntiva sul paziente (ES: sufficienza pancreatica, mutazioni FC rare, ecc.)
- vii. le raccomandazioni nel caso si debba ripetere il test per questi motivi:
  - il paziente non può essere stimolato

- la quantità di sudore raccolta è scarsa
- il primo test ha fornito risultati patologici o borderline
- i risultati non sono fisiologici, cioè cloro o sodio >150 mmol/L, conduttività >170 mmol/L, scarto tra valori di sodio e cloro >20 mmol/L

**BIBLIOGRAFIA:**

1. LE Gibson & RE Cooke A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilising pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics 1959;23;545-549
2. Instruction Manual – sweat power supply
3. Medical Devices Agency. Safety Notice. MDA SN1999(05)
4. Guidelines for the performance of the Sweat Test for the investigation of Cystic Fibrosis in the UK