

IL TEST DEL SUDORE

RACCOMANDAZIONI PER UNA CORRETTA ESECUZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI (Seconda Edizione)

Gruppo di Lavoro
della
Società Italiana per lo Studio della Fibrosi Cistica

Queste Raccomandazioni sono state formalmente valutate ed approvate da:

Società Italiana di Pediatria
Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica
Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili
Società Italiana per lo studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e lo
Screening Neonatale
Società Italiana di Medicina Generale
Lega Italiana Fibrosi Cistica – ONLUS
Società Italiana di Genetica Umana
Società Italiana Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica
Società Italiana di Neonatologia
Società Italiana di Dermatologia medica, chirurgica, estetica e delle Malattie
Sessualmente Trasmesse

[Settembre 2017]

0. GRUPPO DI SVILUPPO DELLE RACCOMANDAZIONI

Gruppo di Lavoro SIFC		
Coordinatore	Funzione	
Dr.ssa Cirilli Natalia	Biologa, CRR per la Fibrosi Cistica - Ancona	
Membri	Funzione	
Dr.ssa Angiolillo Antonella	Biologo, Università del Molise, Osp. Cardarelli - Campobasso	
Tec. Argentini Rita	Tecnico di Laboratorio, Ospedale Bambino Gesù - Roma	
Dr. Bella Sergio	Medico, CRS per la Fibrosi Cistica, Ospedale Bambino Gesù - Roma	
Tec. Borruso Antonella	Tecnico di Laboratorio, CRR per la Fibrosi Cistica - Verona	
Dr.ssa Bignamini Elisabetta	Medico Responsabile, CRR per la Fibrosi Cistica - Torino	
Tec. Brandino Daniela	Tecnico di Laboratorio, CRR per la Fibrosi Cistica - Torino	
Tec. Consalvo Enza	Tecnico di Laboratorio, CRR per la Fibrosi Cistica - Milano	
Inf. Falvino Sonia	Infermiera professionale, CRR per la Fibrosi Cistica - Potenza	
Inf. Marcone Iolanda	Infermiera professionale, CRR per la Fibrosi Cistica - Potenza	
Tec. Menin Laura	Tecnico di Laboratorio, CRR per la Fibrosi Cistica - Verona	
Tec. Mergni Gianfranco	Tecnico di Laboratorio, CRR per la Fibrosi Cistica - Firenze	
Tec. Monteleone Michele	Tecnico di Laboratorio, Laboratorio Analisi, Città della salute e della Scienza - Torino	
Tec. Narzi Fabiana	Tecnico di Laboratorio, CRR per la Fibrosi Cistica - Roma	
Dr.ssa Padoan Rita	Medico Responsabile, CRS per la Fibrosi Cistica - Brescia	
Dr.ssa Polizzi Angela Maria	Biologa, CRR per la Fibrosi Cistica - Bari	
Dr.ssa Puccinelli Maria Paola	Chimico, Laboratorio Malattie Rare, OIRM Sant'Anna - Torino	
Dr.ssa Quattromano Esterina	Biologa, CRR per la Fibrosi Cistica, Messina	
Dr. Ragno Pietro	Fisioterapista, CRR per la Fibrosi Cistica - Lamezia Terme	
Dr.ssa Raia Valeria	Medico Responsabile, CRR per la Fibrosi Cistica - Napoli	
Dr.ssa Salvadori Laura	Biologa, CRR per la Fibrosi Cistica - Napoli	
Dr.ssa Santostasi Teresa	Biologa, CRR per la Fibrosi Cistica - Bari	
Dr. Savoldi Gianfranco	Biologo, Citogenetica e Genetica Medica, AO Spedali Civili - Brescia	
Dr.ssa Seia Manuela	Biologa, Laboratorio Genetica Medica --Fondazione IRCCS Policlinico Mangiagalli-Regina Elena - Milano	
Dr. Scognamiglio Domenico	Chimico, Centro Screening delle Malattie Metaboliche - Napoli	
Dr.ssa Spaggiari Cinzia	Biologa, CRR per la Fibrosi Cistica - Parma	
Dr.ssa Termini Lisa	Medico, CRR per la Fibrosi Cistica - Palermo	
Inf. Vernice Antonella	Infermiera professionale, SS per la Fibrosi Cistica - Cerignola (FG)	
Consulente Metodologo		
Dr. Buzzetti Roberto	Medico, Metodologo della Ricerca - Bergamo	
Revisori esterni		
Prof. Castaldo Giuseppe	Ricercatore CEINGE - Napoli	
Prof. Mastella Gianni	Direttore Scientifico Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica - ONLUS - Verona	
Collaboratori esterni		
Membro	Funzione	Rappresentante
Dr. Corbetta Carlo, Dr. Ubaldo Caruso	Delegati SIMMESN	Società Italiana per lo studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e lo Screening Neonatale
Dr. Cutrera Renato	Presidente SIMRI	Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili
Prof. Capoluongo Ettore	Delegato SIBioC	Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica
Prof. Villani Alberto	Presidente SIP	Società Italiana di Pediatria
Dr. Cricelli Claudio	Presidente SIMG	Società Italiana di Medicina Generale
Dr.ssa Puppo Fornaro Gianna	Presidente LIFC	Lega Italiana Fibrosi Cistica - ONLUS
Dr.ssa Ragusa Angela	Delegato SIGU	Società Italiana di Genetica Umana
Prof.ssa Carla Colombo, Prof. Giuseppe Magazzù	Delegati SIGENP	Società Italiana Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica
Dr. Stronati Mauro	Presidente SIN	Società Italiana di Neonatologia
Dr.ssa Venturini Marina	Delegato SIdEMaST	Società Italiana di Dermatologia medica, chirurgica, estetica e delle Malattie Sessualmente Trasmesse

Key words: sweat test, cystic fibrosis

Raccomandazioni Italiane sul Test del Sudore: <http://www.sifc.it/>

Data prevista per la prossima revisione: [2022]

1. ABBREVIAZIONI

AHCPR	Agency for Health Care Policy and Research
CAP	College of American Pathologists
CF	Fibrosi Cistica
CF-SPID	Cystic Fibrosis, Screening Positive Inconclusive Diagnosis
CFF	Cystic Fibrosis Foundation
CFTR-RD	CFTR Related Disease
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRR	Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica
CRS	Centro Regionale di Supporto per la Fibrosi Cistica
EBM	Evidence Based Medicine
GLTS	Gruppo di Lavoro SIFC sul Test del Sudore
LG	Linea Guida
LIFC	Lega Italiana Fibrosi Cistica – ONLUS
NCCLS	US National Committee for Clinical Laboratory Standards
NEQAS	National External Quality Assessment Scheme
NPD	Nasal Potential Difference
ONLUS	Organizzazione Non Lucrativa di Utilità Sociale
RCPA	Royal College of Pathologists, Australasia
RCT	Randomized Controlled Trial
SIBioC	Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica
SIDeMaST	Società Italiana di Dermatologia medica, chirurgica, estetica e delle Malattie Sessualmente Trasmesse
SIFC	Società Italiana per lo Studio della Fibrosi Cistica
SIGENP	Società Italiana Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica
SIGN	Scottish Intercollegiate Guidelines Network
SIGU	Società Italiana di Genetica Umana
SIMG	Società Italiana di Medicina Generale
SIMRI	Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili
SIN	Società Italiana di Neonatologia
SIP	Società Italiana di Pediatria
SIMMESN	Società Italiana per lo studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e lo Screening Neonatale
SOP	Standard Operating Procedure
SS	Servizio di Supporto per la Fibrosi Cistica
UK	United Kingdom

2. INDICE

0. GRUPPO DI SVILUPPO DELLE RACCOMANDAZIONI.....	2
1. ABBREVIAZIONI	4
2. INDICE	5
3. INTRODUZIONE	7
4. OBIETTIVO	9
5. AREE TEMATICHE	9
6. ASPETTI METODOLOGICI	10
6.1 Il gruppo di lavoro.....	10
6.2 La metodologia di lavoro	11
6.3 La nuova edizione delle raccomandazioni	15
7. NOTE PER I LETTORI.....	15
8. RACCOMANDAZIONI	16
8.1 Informazioni e Condizioni	16
8.1.1 Informazioni al paziente.....	16
8.1.2 Condizioni del paziente.....	21
8.1.3 Test del sudore e screening neonatale.....	22
8.2 Fase Pre-Analitica	22
8.2.1 Raccolta del sudore	22
8.2.2 Soluzioni di elettroliti.....	24
8.2.3 Iontoforesi	25
8.2.4 Sicurezza	26
8.2.5 Mezzo di raccolta	26
8.2.6 Tempo di raccolta.....	26
8.2.7 Rimozione del campione.....	27
8.2.8 Conservazione prima dell'analisi.....	27
8.2.9 Pesatura	27
8.2.10 Definizione di campione adeguato.....	28
8.3 Fase Analitica.....	29
8.3.1 Eluizione del sudore.....	29
8.3.2 Analiti.....	29
8.3.3 Metodologia	30
8.3.4 Modello di referto	32
8.3.5 Qualità.....	35
8.4 Fase Post-Analitica	37

8.4.1	Interpretazione degli elettroliti nel sudore	37
8.4.2	Quando ripetere il test del sudore	40
8.4.3	Ulteriori indagini.....	41
8.5	Responsabilità	43
8.5.1	Responsabilità dell'esecuzione del test e della formazione	43
9.	BIBLIOGRAFIA.....	44
10.	ALLEGATI.....	45
10.1	Elenco delle strutture di Laboratorio presso i Centri di Riferimento Regionale/Servizi di Supporto per la Fibrosi Cistica e Laboratori di Riferimento Regionale per lo Screening Neonatale in Italia dove si esegue il Test del Sudore	45
10.2	Appendice A: elenco mutazioni/varianti note che possono essere associate a test del sudore negativo/borderline	51

3. INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC) è la malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva più frequente nella razza Caucasica con un'incidenza variabile nelle diverse etnie e nei diversi paesi del mondo: 1:2,000-1:3,000 in Europa centro-settentrionale, 1:3,000 nei bianchi d'America, 1:30,000 in Asia^{1,2}.

Le manifestazioni tipiche della malattia sono l'infezione respiratoria e l'insufficienza pancreatica esocrina con elevata concentrazione di elettroliti nel sudore. Queste sono causate da mutazioni del gene che codifica per la proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) sul cromosoma 7. Oltre 2000 mutazioni sono state finora identificate (www.genet.sickkids.on.ca/cftr), ma non tutte causano FC. Anzi sembra ormai certo che l'espressione di molte di queste mutazioni sia determinata sia dall'interazione con geni modificatori che da fattori ambientali. Fino ad oggi la correlazione genotipo/fenotipo è stata documentata per 322 mutazioni (<https://www.cftr2.org/>) ed è in corso un progetto per definire le conseguenze cliniche e funzionali di mutazioni/varianti rare (https://www.ecfs.eu/ecfs_dnwg/projects).

Oggi la fibrosi cistica può manifestarsi fenotipicamente sotto varie forme in un continuum che, partendo dalla forma completa con interessamento polmonare e pancreatico giunge fino a forme monosintomatiche, mono-organo, quali ad esempio l'azoospermia secondaria ad agenesia dei vasi deferenti, generalmente definite atipiche o CFTR-related disorders. Non va altresì dimenticato che con il diffondersi della diagnosi prenatale e dello screening neonatale molte diagnosi di FC vengono poste in epoca prenatale o neonatale. In quei casi in cui lo screening neonatale mostri discordanze tra dosaggio del tripsinogeno, analisi molecolare e test del sudore porre diagnosi di FC può risultare molto difficile. Questi soggetti vengono definiti come CF-SPID (Screening positivo, diagnosi non conclusiva) e sono in genere monitorati per alcuni anni.

Il test del sudore, validato nel 1959 da Gibson e Cooke, costituisce ancora oggi, il gold standard per la diagnosi di FC, in quanto è l'unico test in grado di misurare, in modo riproducibile, il difetto di funzionamento della proteina di membrana CFTR, cioè la elevata concentrazione di ione cloro nel sudore. Indicazioni per il test del sudore includono:

- fenotipo suggestivo di FC
- storia familiare di FC
- screening neonatale per FC positivo
- fenotipo suggestivo di patologia correlata ad FC

Il Test del Sudore (TS):

- a) è una prestazione di medicina di laboratorio inclusa - anche in termini normativi oltre che economici - nelle prestazioni SSN dell'area di Patologia Clinica;
- b) l'esecuzione del TS - fatta salva la fase di stimolazione che deve essere eseguita da personale sanitario autorizzato al contatto/gestione operativa diretto del e sul paziente, preferibilmente rappresentato da personale infermieristico, opportunamente addestrato, o da Dirigente Sanitario di Laboratorio - è di stretta ed assoluta competenza dell'Area di Medicina di Laboratorio, inclusa la funzione di refertazione con annessi commenti interpretativi;
- c) l'esecuzione in ambito clinico è possibile unicamente previa documentata autorizzazione della competente Direzione dell'Area di Medicina di Laboratorio, che deve assumersi in ogni caso la responsabilità tecnico-professionale e medico-legale della prestazione.

Nella quasi totalità dei pazienti FC con caratteristiche tipiche e mutazioni identificate, il test del sudore è diagnostico. Nelle patologie FC correlate (CF-SPID e CFTR-related disease) il test del sudore può risultare negativo o intermedio (borderline), pertanto non sono pienamente soddisfatti i criteri di diagnosi per la FC. La diagnosi di FC può rimanere incerta in quei pazienti con caratteristiche cliniche suggestive di FC, test del sudore intermedio o negativo e 1 o 2 mutazioni non identificate. In questi casi saranno utili per la diagnosi ulteriori studi della funzione della proteina (misura dei potenziali nasali o delle correnti intestinali). Molto raramente il test del sudore è normale in un paziente con mutazioni che causano FC.

I dati di letteratura confermano che con il test del sudore è possibile diagnosticare circa il 98% dei pazienti affetti da FC; eppure, l'1-2% dei pazienti con manifestazioni cliniche suggestive di FC hanno un test del sudore con valori normali o borderline. Inoltre, dai dati di letteratura risulta che il test del sudore, molto dipendente dalla manualità dell'operatore, ha percentuali non accettabili di falsi positivi (fino al 15%) e di falsi negativi (fino al 12%). Per queste ragioni è d'importanza critica che il test del sudore venga eseguito in maniera il più possibile standardizzata, per consentire l'interpretazione clinica dei risultati.

Dati ottenuti dal II° audit effettuato in Italia nel 2009 hanno dimostrato che nel 66,6% dei centri FC la raccolta e l'analisi del sudore vengono eseguite in una struttura di Medicina di Laboratorio, nel resto dei centri l'intera procedura viene eseguita presso il Centro di cura. Il test del sudore si esegue con regolarità nell'85,1% di questi centri.

Il secondo **audit** condotto in Italia nel 2009, dopo la pubblicazione delle raccomandazioni italiane sul test del sudore, ha coinvolto 43 Centri FC, sia Centri di Riferimento Regionali, sia Servizi di Supporto, sia laboratori di screening neonatale. Anche questo secondo audit, come il precedente, condotto nell'anno 2006 ha mostrato un'ampia variabilità nella pratica e negli standard in uso. Suscitano in particolare riflessioni:

- a) la mancanza di un adeguato controllo di qualità dei metodi analitici;
- b) la variabilità negli intervalli di riferimento;
- c) la non adeguatezza delle informazioni fornite al paziente/genitori.

I risultati emersi dal secondo audit, sono stati inclusi in questa seconda edizione.

Questa seconda edizione delle raccomandazioni italiane sul test del sudore si arricchisce dei risultati di studi per lo più non randomizzati pubblicati sull'argomento e delle novità contenute nelle linee guida, raccomandazioni e consensus internazionali pubblicate dopo il 2007.

4. OBIETTIVO

Obiettivo specifico di questa seconda edizione è fornire una versione aggiornata delle raccomandazioni precedentemente presentate. Obiettivo più generale resta quello di diffondere maggiormente la cultura della fibrosi cistica per quanto attiene gli aspetti diagnostici in tutti gli ambiti della medicina pediatrica e non.

5. AREE TEMATICHE

Anche in questa seconda edizione, le raccomandazioni coprono i seguenti aspetti:

- L'informazione al paziente
- L'idoneità del soggetto da sottoporre al test
 - fisiologia
 - stato clinico
 - esclusioni/restrizioni
- La raccolta del sudore
 - sito di raccolta
 - metodi di stimolazione ed equipaggiamento
 - mezzo di raccolta/tempo/contenitori
- L'analisi del sudore
 - pesatura
 - eluizione
 - analiti
 - metodi analitici
 - referto
- La qualità
 - controllo di qualità interno
 - verifica esterna di qualità
 - audit
- I valori di riferimento e l'interpretazione
 - definizioni

- falsi positivi e falsi negativi
- indicazioni per ripetere il test
- uso di altri test
- La responsabilità dell'esecuzione del test e la formazione del personale

6. ASPETTI METODOLOGICI

6.1 *Il gruppo di lavoro*

Il Gruppo di Lavoro SIFC sul Test del Sudore (GLTS) nasce all'inizio del 2006 in seno alla Società Italiana per lo Studio della Fibrosi Cistica. In questi anni il gruppo si è impegnato a stimolare e sviluppare un dibattito culturale sul tema tra tutti gli attori che si interfacciano con questo test (laboratoristi, clinici ospedalieri, pediatri, medici di famiglia e specialisti, infermieri, ecc). Il gruppo ha anche promosso progetti di ricerca quali:

- la validazione di materiali di controllo analitico su 3 livelli per il test del sudore (2008)
- implementazione delle raccomandazioni italiane sul test del sudore (2008-2009)
- secondo audit nazionale sul test del sudore (2009)
- validazione materiali su 3 livelli per CQI in collaborazione con ditta LTA (2011)
- programma pilota di Valutazione Esterna della Qualità in collaborazione con L'Istituto Superiore di Sanità (2014), divenuto poi programma Nazionale di Verifica Esterna della Qualità (2015)

Inoltre alcuni esponenti del GLTS hanno promosso progetti di ricerca sia in ambito nazionale che internazionale:

- Survey europea sul test del sudore, in collaborazione con l'ECFS Diagnostic Network Working Group (2015)
- Progetto di ricerca sulla variabilità biologica intra-individuale del cloro nel sudore, finanziato dalla Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (2015)
- Traduzione Linee Guida UK, 2nd Edition, 2014 (2017) (www.sifc.it)

La composizione del Gruppo di lavoro per la formulazione di raccomandazioni per la corretta esecuzione del test del sudore risponde a criteri di:

- competenza professionale e scientifica e specifica preparazione in ambito FC (medicina di laboratorio, EBM, ecc.)
- rappresentanza delle diverse professionalità coinvolte nella gestione del test del sudore, nonché rappresentanza dei pazienti e delle loro famiglie
- rappresentanza geografica dei diversi centri di cura

Il gruppo è stato coordinato dalla Dr.ssa Cirilli Natalia, biologo.

Il lavoro di stesura e revisione della seconda edizione è stato svolto sotto la supervisione di un metodologo esperto nella ricerca e analisi della letteratura scientifica e nella produzione e implementazione di linee guida, Dr. Roberto Buzzetti.

I membri del GLTS sono elencati a pag. 2 e sono rappresentativi di diverse professionalità. Questa seconda edizione è stata formalmente valutata ed approvata dalle Società Scientifiche elencate nel frontespizio del documento.

6.2 La metodologia di lavoro

Il processo della ricerca delle prove di efficacia ha seguito una strategia di selezione gerarchica: è iniziata cioè con la ricerca di **linee guida** e documenti di **consenso** pubblicati su questo argomento posteriormente al 2007 (anno di pubblicazione della prima edizione delle raccomandazioni italiane). La ricerca è stata poi integrata con l'identificazione di **studi primari** e **secondari** pubblicati successivamente al 2007 (attraverso la consultazione di banche dati quali: Cochrane Library e PubMed-Medline, dando priorità agli studi controllati randomizzati, ma senza trascurare l'inclusione di studi non randomizzati).

Sono stati identificati 10 documenti presentati come **linee guida** o **consensus**^{3,10}. Si veda in proposito la tabella 1, che riassume i principali aspetti metodologici di questi documenti:

Tab. 1: Linee guida e consensus sul test del sudore post 2007

Documento	Commenti
LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ Jr; Cystic Fibrosis Foundation. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. J Pediatr 2007;151(19):85-9	Non vengono forniti elementi metodologici. 23 raccomandazioni. Si tratta di un documento con compiti normativi, legati anche all'accreditamento. Basato sul documento del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) C34-A2
Green A, Kirk J. Guidelines Development Group. Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. Ann Clin Biochem 2007;44(Pt 1):25-34	Articolo di presentazione delle LG inglesi del 2003, che non sono più state aggiornate
Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, <i>et al.</i> Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr 2008;153(2):S4-S14	Consensus Report della Cystic Fibrosis Foundation (FFC). Non vi è descrizione dei metodi utilizzati per formulare le raccomandazioni
Rota M, Nguyen-Khoa T, Marchand M, et al; Groupe de travail Test de la sueur du Collège national de biochimie des hôpitaux. Sweat testing: review of technical requirements. Ann Biol Clin (Paris). 2008;66(2):221-7	Report tecnico/documento di consenso del gruppo di lavoro sul test del sudore della Società Francese di Biochimica Clinica .
LeGrys VA, Applequist R, Briscoe DR, et al. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis: Approved Guideline, Third Edition. CLSI Document C34-A3. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009	Documento di consenso del CLSI , prodotto con metodi formali per il raggiungimento del consenso stesso, da parte di un gruppo multidisciplinare internazionale.

Barrio Gómez de Agüero MI, Garecía Hernández G, Gartner S: Grupo de Trabajo de Fibrosis Quística. Protocol for the diagnosis and follow up of patients with cystic fibrosis. An Pediatr (Barc) 2009;71(3):250-64	Protocollo del gruppo di lavoro spagnolo sulla FC con raccomandazioni tratte da European Cystic Fibrosis Society e Cystic Fibrosis Foundation.
Coakley J, Scott S, Mackay R, et al. Sweat testing for cystic fibrosis: standards of performance in Australasia. Ann Clin Biochem 2009; 46: 332-337	Linee guida sulla corretta esecuzione ed interpretazione del test del sudore da parte del gruppo di lavoro australiano
Sermet-Gaudelus I, Munck A, Rota M, Roussey M, Feldmann D, Nguyen-Khoa T; Groupe de travail "Dépistage néonatal" de la Fédération des centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose. French guidelines for sweat test practice and interpretation for cystic fibrosis neonatal screening. Arch Pediatr 2010 17(9):1349-58 Sermet-Gaudelus I, Munck A, Rota M, Roussey M, Feldmann D, Nguyen-Khoa T, le groupe de travail « Dépistage néonatal » de la Fédération des centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose Erratum à l'article « Recommandations françaises pour la réalisation et l'interprétation du test de la sueur dans le cadre du dépistage néonatal de la mucoviscidose » [Arch Pediatr 2010;17(9):1349-58]. Arch Pediatr 2010;17(12):1730	Raccomandazioni sull'esecuzione e l'interpretazione del test del sudore nello screening neonatale per la fibrosi cistica del gruppo di lavoro francese sullo screening neonatale FC . Manca il grading e le raccomandazioni non sono chiaramente evidenziate
Guidelines for the performance of sweat test for the investigation of Cystic Fibrosis in the UK 2 nd version. An evidence-based guideline (March 2014) (www.acb.org.uk)	Linee Guida evidence-based sul test del sudore dell'Association for Clinical Biochemistry & Laboratory Medicine inglese
Farrell PM, White TB, Ren CL, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. J Pediatr. 2017;181S:S4-S15	Linee guida per la diagnosi di Fibrosi Cistica; valori normali di Cloro <30 mmol/L per tutte le fasce d'età

La ricerca di **studi primari** e **secondari** dal 2007 ad aprile 2017 ha permesso l'identificazione di:

- n° 30 studi sulle informazioni e condizioni del paziente (§ 8.1)
- n° 4 studi sui test del sudore e screening neonatale (§ 8.1.3)
- n° 3 studi sulle soluzioni di elettroliti (§ 8.2.2)
- n° 20 studi sulla metodologia (§ 8.3.3)
- n° 5 studi sulla qualità (§ 8.3.5)
- n° 23 studi sull'interpretazione degli elettroliti nel sudore (§ 8.4.1)
- n° 1 studio su quando ripetere il test del sudore (§ 8.4.2)
- n° 15 studi su ulteriori indagini (§ 8.4.3)
- n° 20 reviews, surveys e studi su altri temi (§ 9)

Alla luce della letteratura reperita, possiamo affermare che le LG inglesi in particolare offrono garanzia di qualità nella loro costruzione, in quanto:

- a) sono state prodotte con una rigorosa e sistematica ricerca e analisi delle evidenze disponibili

- b) contengono raccomandazioni elaborate da un gruppo multidisciplinare
- c) per classificare le raccomandazioni sono stati adottati i criteri di grading, accreditati a livello internazionale, dello Scottish Intercollegiate Guidelines Network (<http://www.sign.ac.uk/>), qui sotto riportati (vd. Tab. 1)
- d) sono anche apprezzabili dal punto di vista della chiarezza e dell'indipendenza editoriale, in termini di mancanza di conflitti di interesse

Tab. 2: I criteri di grading del SIGN**Livello dell'evidenza:**

Livello	Classificazione dell'evidenza (basato sui criteri del SIGN 2000)
1++	evidenza da meta-analisi di alta qualità, revisioni sistematiche di RCT o RCT con un rischio molto basso di bias
1+	evidenza da randomizzato meta-analisi ben condotte, revisioni sistematiche di RCT o RCT con basso rischio di bias
1-	evidenza da randomizzato meta-analisi, revisioni sistematiche di RCT, o RCT con un alto rischio di bias
2++	evidenza da revisioni sistematiche di alta qualità di studi caso-controllo o di coorte o studi caso-controllo o di coorte di alta qualità con un rischio molto basso di confondimento, bias o caso e una moderata probabilità che la relazione sia causale
2+	evidenza da studi caso-controllo o di coorte ben condotti con un basso rischio di confondimento, bias o caso e una moderata probabilità che la relazione sia causale
2-	evidenza da studi caso-controllo o di coorte con un alto rischio di confondimento, bias o caso ed un significativo rischio che la relazione non sia causale
3	evidenza da studi non-analitici, come i case reports ed i case series
4	evidenza da opinione di esperti

Forza delle raccomandazioni:

Grado	Tipo di raccomandazione (basata sui criteri dell'AHCP 1992)
A (livello 1++)	richiede almeno una meta-analisi o trial randomizzato e controllato valutato come 1++, direttamente applicabile alla popolazione target e che dimostri una complessiva consistenza dei risultati
B (livelli 1++, 1+ e 2++)	richiede un'evidenza che deriva da studi valutati come 2++, direttamente applicabili alla popolazione target e che dimostrino una consistenza complessiva dei risultati, o un'evidenza estrapolata da studi valutati come 2++
C (livelli 2+ o 2++)	richiede un'evidenza che deriva da studi valutati come 2+, direttamente applicabili alla popolazione target che dimostrino una consistenza complessiva dei risultati o un'evidenza estrapolata da studi valutati come 2++
D (livelli 2+, 3 o 4)	livello di evidenza 3 o 4, o evidenza estrapolata da studi valutati come 2+

L'aggiornamento delle varie sezioni delle raccomandazioni italiane sul test del sudore è stata affidata a piccoli gruppi come di seguito indicato:

- a) Informazioni al paziente e condizioni del paziente → clinici
- b) Raccolta del sudore, soluzioni, supporti, iontoforesi, mezzo e tempo di raccolta → tecnici di laboratorio ed infermieri
- c) Fase pre-analitica (conservazione, pesatura, definizione di campione adeguato) → tecnici di laboratorio ed infermieri
- d) Fase analitica (eluizione, analiti, metodologia) → biologi
- e) Modello di referto, qualità → biologi e clinici
- f) Interpretazione elettroliti nel sudore, quando ripetere il test, ulteriori indagini → biologi e clinici
- g) Responsabilità intero processo → infermieri, tecnici di laboratorio, biologi e clinici

Il **consenso** su OGNI singola raccomandazione da parte del panel di professionisti che componevano il gruppo multidisciplinare è stato raggiunto in una riunione finale svoltasi in teleconferenza. Il testo definitivo è stato approvato e validato da tutti i membri del team multidisciplinare.

Le raccomandazioni qui presentate sono accompagnate dal livello di grading della LG originale.

Successivamente, le raccomandazioni sono state sottoposte a due revisori esterni. Dopo il loro responso, il testo è stato ulteriormente perfezionato e il gruppo ha formalizzato definitivamente il documento.

I lavori del Gruppo si sono svolti totalmente per via informatica secondo una timetable così definita:

FASE	TEMPO
Costituzione gruppi di lavoro	1 mese
Ricerca bibliografica	
Valutazione critica dei documenti reperiti	3 mesi
Analisi della situazione italiana (2° audit già effettuato)	-
Integrazione della prima edizione	2 mesi
Distribuzione bozza della seconda edizione ai revisori esterni ed ai membri delle società scientifiche coinvolte + LIFC	1 mese
Riunione tecnica multidisciplinare in teleconferenza per editing	1 giorno
Diffusione del documento	1 mese
TOT	9 mesi

I lavori sono iniziati ad Agosto 2016 e sono terminati a Maggio 2017. Il coordinatore ha monitorato periodicamente lo stato di avanzamento del lavoro con la supervisione del consulente metodologo.

I costi che il Gruppo di Lavoro ha sostenuto sono stati sostenuti dalla Società Italiana per lo Studio della Fibrosi Cistica.

Il gruppo è consapevole della necessità di sottoporre ad aggiornamento le raccomandazioni. La prossima revisione è prevista nel 2022, o comunque in occasione della comparsa di nuovi importanti studi in letteratura.

6.3 La nuova edizione delle raccomandazioni

Questa 2^a edizione delle Raccomandazioni Italiane sul Test del Sudore scaturisce da un'esigenza di aggiornamento della 1^o edizione a seguito della riedizione nel 2014 delle linee guida inglesi, le uniche evidence-based. Rispetto ad altre raccomandazioni/consensus già esistenti, questo documento si distingue per integrare le raccomandazioni inglesi con:

- dettagli tecnico-operativi e suggerimenti applicativi derivanti soprattutto dalle linee guida e documenti di consenso internazionali indicati come note (Tab 1)
- suggerimenti emersi dagli oltre 50 studi primari consultati

Questa edizione inoltre ripropone:

- tabelle (Es: indicazioni al test; patologie con elettroliti nel sudore elevati)
- allegati (Es: foglio informativo per pazienti/genitori; modello di referto)
- note tecniche derivanti dal parere di esperti (membri del Gruppo di Lavoro SIFC sul Test del Sudore, membri delle Società Scientifiche coinvolte e revisori esterni) e da riferimenti normativi

7. NOTE PER I LETTORI

Il testo sintetico delle linee guida inglesi viene riportato come nel documento originale sotto forma di tabella composta da 2 colonne:

- colonna 1: è composta da tante righe corrispondenti a ciascuna raccomandazione (testo in nero)
- colonna 2: viene indicata la forza della raccomandazione (vedi criteri SIGN, § 6.2)

Le integrazioni alle raccomandazioni inglesi sono riportate in colonna 1 con il testo scritto in blu e tra parentesi in nero vengono riportate la fonte e l'anno di riferimento.

Per un maggior approfondimento degli argomenti trattati si rimanda il lettore al testo analitico delle linee guida inglesi.

8. RACCOMANDAZIONI

8.1 Informazioni e Condizioni

8.1.1 Informazioni al paziente

Informazioni al paziente	Forza della raccomandazione
Il <u>consenso informato</u> dovrebbe essere ottenuto in accordo con la normativa locale	D
E' buona pratica clinica preparare efficacemente il paziente e, dove appropriato, i genitori prima del test fornendo informazioni individualizzate. Le <u>informazioni</u> 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 soggetto durante il test ed i contatti utili ulteriori informazioni sul test ed i risultati finali. Un volantino di esempio per i pazienti/genitori viene fornito (vd. Allegato)	

Risultati Audit (2009)

In nessun Centro FC viene richiesto il consenso informato, d'altra parte il 33,3% (15,1% nell'audit 2006) fornisce informazioni verbali e scritte al paziente/genitori.

Allegato

Esempio di foglio informativo per pazienti/genitori (GLTS, 2007)

Tabella

Indicazioni al test del sudore (CLSI, 2009)

Riferimenti bibliografici

- Doull IJM, Hall SJ, Bradley DM. A sweat test centered protocol for the disclosure and diagnosis of cystic fibrosis in a newborn screening program. *Pediatr Pulmonol* 2007;42(9):773-8
- Klebanova Y, LeGrys V, Cooper D, Levy D, Santora D, Schwindt C. A case of localized adrenergic urticaria mimicking an allergic reaction to a sweat chloride test. *Pediatr Pulmonol* 2009;44(9):935-8
- Beucher J, Leray E, Deneuve E, et al. Psychological effects of false-positive results in cystic fibrosis newborn screening: a two-year follow-up. *J Pediatr* 2010 May;156(5):771-6
- Strekalova YA. Finding Motivation: Online Information Seeking Following Newborn Screening for Cystic Fibrosis. *Qual Health Res.* 2016 Jul;26(9):1180-90
- Jessup M, Douglas T, Priddis L, Branch-Smith C, Shields L; AREST-CF. Parental Experience of Information and Education Processes Following Diagnosis of Their Infant With Cystic Fibrosis Via Newborn Screening. *J Pediatr Nurs* 2016 May-Jun;31(3):e233-41
- Rueegg CS, Barben J, Hafen GM, et al; Swiss Cystic Fibrosis Screening Group. Newborn screening for cystic fibrosis - The parent perspective. *J Cyst Fibros* 2016 Jul;15(4):443-51
- Hayeems RZ, Miller FA, Barg CJ. Parent Experience With False-Positive Newborn Screening Results for Cystic Fibrosis. *Pediatrics* 2016 Sep;138(3). pii: e20161052. doi: 10.1542/peds.2016-1052. Epub 2016 Aug 2.
- Chudleigh J, Buckingham S, Dignan J. Parents' Experiences of Receiving the Initial Positive Newborn Screening (NBS) Result for Cystic Fibrosis and Sickle Cell Disease. *J Genet Couns* 2016;25(6):1215-26
- Hayeems RZ, Miller FA, Barg CJ, et al. Psychosocial Response to Uncertain Newborn Screening Results for Cystic Fibrosis. *J Pediatr* 2017 Mar 6. pii: S0022-3476(17)30159-2
- Sermet-Gaudelus I, Brouard J, Audrézet MP, et al. [Management of infants whose diagnosis is inconclusive at neonatal screening for cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* 2017 Apr;24(4):401-414

Esempio di foglio informativo sul test del sudore per pazienti/genitori (GLTS, 2007)

(su carta intestata del servizio che eroga la prestazione)

Questo foglio è stato elaborato per fornirVi informazioni sul test che è stato prescritto a Voi o Vostro/a figlio/a. Qui vi spieghiamo cosa è il test del sudore, perché viene richiesto, in cosa consiste, come raggiungere il dipartimento dove viene eseguito, cosa possono significare i diversi 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) contenuta nel sudore.

Perché si esegue?

Il test viene richiesto dal medico per confermare o escludere la diagnosi di Fibrosi Cistica (FC) in bambini o adulti che presentano sintomi che hanno fatto sospettare la presenza di questa malattia. I sintomi che più frequentemente inducono il medico a richiedere il test del sudore sono nel bambino: infezioni respiratorie ricorrenti, diarrea cronica, scarsa crescita, grave disidratazione nel periodo estivo; nell'adulto: pancreatite cronica o ricorrente, infertilità maschile, rinosinusite cronica, infezioni polmonari ricorrenti o croniche. Tutti questi sintomi possono essere dovuti ad una forma di Fibrosi Cistica non ancora riconosciuta. È importante diagnosticare questa condizione al fine di instaurare il trattamento più idoneo ed efficace. Inoltre il test viene richiesto nei lattanti che sono risultati positivi al programma di screening neonatale in atto in questa Regione, proprio perché il programma di screening seleziona neonati a rischio di malattia nei quali è necessaria la conferma o esclusione per mezzo anche del test del sudore. 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.

Chi esegue il test?

(inserire i dati relativi al servizio offerto).

In cosa consiste il test?

Dopo accurata detersione della cute 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 circa 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 demineralizzata ed asciugata. Un pezzo di carta da filtro, una garza o talvolta un capillare di plastica avvolto a spirale, viene posizionato e assicurato sulla zona stimolata. Vi verrà allora chiesto di attendere per 30 minuti finché il sudore non viene assorbito dalla carta da filtro, dalla garza o dal dispositivo a spirale. Durante questi 30 minuti Voi (o il Vostro 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, la garza o la spirale viene quindi rimossa dall'operatore e inviata al laboratorio per l'analisi del sudore.

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. Eccezionalmente nell'area di cute sottoposta a stimolazione elettrica si potrebbe avere una modestissima ustione.

I risultati

Come ogni altro test di laboratorio, i risultati sono espressi come misura della concentrazione di sali (usualmente cloro), e sono valutati rispetto ad intervalli di riferimento (o valori di normalità) predefiniti in funzione dell'età del paziente. I valori entro i limiti di riferimento sono considerati NEGATIVI, quelli che invece superano tali intervalli sono considerati POSITIVI e saranno attentamente valutati dal vostro Medico Curante insieme ad altri vostri dati clinici e di laboratorio per definire lo stato di rischio per malattia: la diagnosi di Fibrosi Cistica è una diagnosi clinica e la sola positività del test del sudore non è sufficiente per stabilire se un soggetto è affetto o meno dalla malattia. Talvolta i risultati possono risultare in un intervallo dubbio (o borderline) che non permette la diagnosi o la esclusione della malattia: il vostro Medico Curante provvederà a definire gli approfondimenti clinici e di laboratorio necessari per un corretto inquadramento clinico di questo risultato. In pochi casi il test può avere necessità di essere ripetuto per ragioni tecniche, quali ad esempio una scarsa quantità di sudore raccolto.

Quanto tempo passa prima di ricevere i risultati del test?

(inserire i dati relativi al servizio offerto).

Chi Vi informa dei risultati del test?

(inserire i dati relativi al servizio offerto). Dopo aver ricevuto il risultato del test riportatelo al medico che Ve lo ha prescritto e discutete con lui il risultato.

Altre domande

Se avete domande relative all'esecuzione del test, cortesemente contattate (inserire i dati relativi al servizio offerto). Se avete altre domande relative alla prescrizione del test del sudore nel Vostro caso (o in quello di Vostro/a figlio/a) parlatene con il medico di famiglia/specialista che Vi ha consigliato di eseguire questo test così che possa fornirVi ulteriori informazioni o potete rivolgerVi ad un medico del Centro specialistico per la FC di

Indicazioni al test del sudore (CLSI, 2009)

Indicazioni delle alte e basse vie respiratorie	Indicazioni gastrointestinali	Altre indicazioni
Tosse cronica/pertussioide	Ileo da meconio/peritonite meconiale/atresia ileale	Familiarità positiva per FC anche in assenza di sintomi
Polmoniti croniche o ricorrenti	Riscontro ecografico prenatale di anse intestinali iperecogene	Scarso accrescimento
Wheezing persistente o ricorrente	Sindrome da tappo da meconio	Sudore salato
Iperinflazione polmonare persistente o ricorrente	Ittero neonatale prolungato	Cristalli di sale sulla pelle
Tachipnea persistente o ricorrente	Ostruzione intestinale acuta neonatale	Sindrome da deplezione salina
Rientramenti (al giugulo, intercostali) persistenti o ricorrenti	Perforazione spontanea del colon neonatale	Alcalosi metabolica
Atelectasie (specie del lobo superiore destro)	Steatorrea	Ipoprotrombinemia – Sindrome emorragica da deficit di vitamina K
	Prolasso rettale	Ipoitaminosi A e/o E
	Mucocele appendicolare	Corrugamento transitorio della cute delle mani esposte ad acqua
Bronchiectasie	Sindrome da ostruzione distale ileale/stipsi ostinata	Ritardo nello sviluppo
Emottisi	Epatopatia di natura non definita	Azoospermia - Oligospermia
Presenza di batteri caratteristici nell'escreato (Pseudomonas, Stafilococco, ecc)	Colestasi/ittero colestatico neonatale protratto	Assenza bilaterale (ma anche monolaterale) dei vasi deferenti
Polipi nasali/mucocele/pseudomucocele	Cirrosi	Calcificazione scrotale
Pansinusite	Iperensione portale	Ipoproteinemia
Ippocratismo digitale	Pancreatiti ricorrenti	Presenza di 2 mutazioni CF-related nel feto
		Edema
		Screening neonatale FC positivo

Riferimenti bibliografici

- Cameron C, Lodes MW, Gershan WM. Facial nerve palsy associated with a low serum vitamin A level in an infant with cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2007;6(3):241-3
- Portes KP, Marone SAM, Goto EY, Palma C, Jorge MRMF, Szkudlarek DAC. Cystic fibrosis-associated bilateral pseudomucocele - Case report. Braz J Otorhinolaryngology 2007;73(6):852-6
- Laux D, Tippelt S, Weinmann G, Sauerbrey A. Developmental delay. An unusual cardinal symptom of a failure to thrive in cystic fibrosis and celiac disease. Padiatrische Praxis 2008;71(4):565-71
- Baral V, Connett G. Acute intestinal obstruction as a presentation of cystic fibrosis in infancy. J Cyst Fibros 2008;7(4):277-9

- Augusto JF, Sayegh J, Malinge MC, Illouz F, Subra JF, Ducluzeau PH. Severe episodes of extra cellular dehydration: an atypical adult presentation of cystic fibrosis. *Clin Nephrol* 2008;69(4):302-5
- Siddiqui MMF, Burge DM. Neonatal spontaneous colonic perforation due to cystic fibrosis. *Pediatr Surg Int* 2008;24(7):863-4
- Gild R, Clay CD. Aquagenic wrinkling of the palms in a cystic fibrosis carrier. *Australasian Journal of Dermatology* 2008;49:19-20
- Bernstein ML, McCusker MM, Grant-Kels JM. Cutaneous manifestations of cystic fibrosis. *Pediatr Dermatol* 2008;25:150–157
- Hasosah M, Davidson G, Jacobson K. Persistent elevated tissue-transglutaminase in cystic fibrosis. *J Pediatr Child Health* 2009;45(4):172-3
- Berk DR, Ciliberto HM, Sweet SC, Ferkol TW, Bayliss SJ. Aquagenic wrinkling of the palms in cystic fibrosis: comparison with controls and genotype-phenotype correlations. *Archives of Dermatology* 2009;145(11):1296-9
- Ludgate MW, Patel D, Lamb S. Tobramycin-induced aquagenic wrinkling of the palms in a patient with cystic fibrosis. *Clin Exp Dermatol* 2009;34:e75–e77
- Stewart LC, Doe SJ, Bourke SJ, et al. Aquagenic palmar wrinkling as a presenting feature of cystic fibrosis gene dysfunction. *Clin Exp Dermatol* 2009;34:e647–e649
- Gild R, Clay C, Morey S. Aquagenic wrinkling of the palms in cystic fibrosis and the cystic fibrosis carrier state: a case–control study. *British Journal of Dermatology* 2010;163:1082–4
- Garcon-Michel N, Roguedas-Contios AM, Rault G, et al. Frequency of aquagenic palmoplantar keratoderma in cystic fibrosis: a new sign of cystic fibrosis? *Br J Dermatol* 2010;163:162–166
- Tolland JP, Boyle J, Hall V, et al. Aquagenic wrinkling of the palms in an adult cystic fibrosis population. *Dermatology* 2010;221:326–330
- Park L, Khani C, Tamburro J. Aquagenic Wrinkling of the Palms and the Potential Role for Genetic Testing. *Pediatr Dermatol* 2012;29(3):237-42
- Arkin LM, Flory JH, Shin DB, et al. High prevalence of aquagenic wrinkling of the palms in patients with cystic fibrosis and association with measurable increases in transepidermal water loss. *Pediatr Dermatol* 2012 Sep-Oct;29(5):560-6
- Wilder-Smith EP. Aquagenic wrinkling of the palms is due to vasoconstriction of palmar skin vasculature. *Med Hypotheses* 2013 Nov;81(5):963-5
- Chinazzo C, De Alessandri A, Menoni S, Romanisio G, Rebora A, Rongioletti F. Aquagenic wrinkling of the palms and cystic fibrosis: an Italian study with controls and genotype-phenotype correlations. *Dermatology* 2014;228(1):60-5
- Grimaldi C, Brémont F, Berlioz-Baudoin M, et al. Sweat test practice in pediatric pulmonology after introduction of cystic fibrosis newborn screening. *Eur J Pediatr* 2015;174:1613-1620

8.1.2 Condizioni del paziente

Condizioni del paziente	Forza della raccomandazione
Il test del sudore può essere eseguito dopo <u>2 settimane</u> di età nei bambini con peso superiore a <u>2 Kg</u> che sono normalmente idratati e senza malattia sistemica significativa.	C
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	C
Il test del sudore dovrebbe essere <u>rimandato</u> nei soggetti <u>edematosi</u> o in trattamento con <u>topiramato</u> o in trattamento con <u>9-alfa-fludrocortisone</u>	D
Il test del sudore deve essere <u>rimandato</u> nei soggetti <u>disidratati</u> , <u>sottopeso</u> , <u>con patologie sistemiche</u> , o affetti da <u>eczema nel sito di stimolazione</u>	D
Il test del sudore può essere eseguito in soggetti in trattamento con flucloxacillina	C
Il test del sudore non dovrebbe essere eseguito in soggetti in <u>O₂ terapia con dispositivo aperto</u> (includere le capette solo testa). Sono esclusi i neonati con <u>cannule nasali o maschera facciale</u>	D

NOTE

- In età neonatale, il peso del paziente al momento dell'esecuzione del test è un importante fattore condizionante l'esito del test, in quanto un peso ridotto (< 3.0 kg) può determinare una raccolta insufficiente di sudore. Tuttavia esso non è elemento sufficiente ed assoluto per la non esecuzione o la posticipazione del test se il rischio di malattia è valutato come elevato. In caso di raccolta insufficiente, il test verrà riprogrammato in un'età successiva, che può variare da caso a caso
- Nei neonati pretermine l'esecuzione del test del sudore prima delle 39 settimane (età gestazionale + età al test del sudore) aumenta la probabilità di insuccesso
- E' preferibile eseguire il test del sudore dopo almeno 4 giorni dalla sospensione del trattamento corticosteroidico per via sistemica, in quanto i corticosteroidi riducono la concentrazione degli elettroliti nel sudore
- Non eseguire il test nei soggetti portatori di pacemaker e placche metalliche, poiché la ionoforesi è controindicata in questi soggetti

Risultati Audit (2009)

Solo il 44,4% (31,2% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati rispetta la condizione del limite d'età di 2 settimane di vita; il 66,6% dei Centri FC intervistati rispetta la condizione di 3,5 Kg di peso corporeo. L'81,4% (90,6% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati esegue il test a soggetti normoidratati, il 62,9% (50% nell'audit 2006) non lo esegue in soggetti con patologia acuta, l'81,4% (65,6% nell'audit 2006) non lo esegue in soggetti con eczema, il 62,9% (62,5% nell'audit 2006) non lo esegue in soggetti edematosi, il 70,3% (53,1% nell'audit 2006) non lo esegue in soggetti in trattamento corticosteroidico, il 66,6% (34,3% nell'audit 2006) non lo esegue in soggetti in ossigenoterapia con dispositivo aperto.

8.1.3 Test del sudore e screening neonatale

Screening neonatale	Forza della raccomandazione
Il test del sudore è un test chiave per la conferma diagnostica di fibrosi cistica in un neonato positivo allo screening neonatale	C
Il test del sudore eseguito nell'ambito dello screening neonatale dovrebbe essere eseguito in laboratori con comprovata esperienza nell'esecuzione del test in soggetti con meno di 3 mesi di età	D
I risultati del test del sudore dovrebbero essere disponibili alla prima visita per i neonati identificati con lo screening neonatale	D

NOTE

L'esecuzione di TS nell'ambito del protocollo di screening neonatale della FC, deve tener conto di criteri/parametri peculiari relativi a:

- selezione del neonato per condizioni di rischio;
- intervallo massimo tra richiesta d'esecuzione (per confermata positività d'ipertripsinemia associata o meno a presenza di 1 mutazione FC) ed esecuzione effettiva del TS, in funzione anche di età gestazionale, peso neonatale, condizioni cliniche del neonato;
- peculiarità delle informazioni alla famiglia (integrazione delle informazioni relative all'esecuzione, per fini diagnostici, del test del sudore);
- definizione degli intervalli temporali massimi accettabili tra presa in carico di neonato ad alto rischio presso Centro Clinico ed esecuzione di TS (2° test di conferma o test basale in caso di presa in carico di neonato con 2 mutazioni FC identificate in fase di screening biochimico-molecolare)

Riferimenti bibliografici

- Nelson MR, Adamski CR, Tluczek A. Clinical practices for intermediate sweat tests following abnormal cystic fibrosis newborn screens. *J Cyst Fibros* 2011;10(6):460-5
- Guglani L, Sitwat B, Lower D, et al. Elevated Sweat Chloride Concentration in Children Without Cystic Fibrosis Who are Receiving Topiramate therapy. *Pediatr Pulmonol* 2012;47:429-33
- Massie J, Gillam L. Uncertain diagnosis after newborn screening for cystic fibrosis: An ethics-based approach to a clinical dilemma. *Pediatr Pulmonol* 2014;49(1):1-7

8.2 Fase Pre-Analitica

8.2.1 Raccolta del sudore

Raccolta del sudore	Forza della raccomandazione
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	D
Grande attenzione va posta in tutte le fasi della procedura per impedire la contaminazione. Evitare l'uso di soluzioni contenenti cloro per la detersione della cute o l'applicazione di gel anestetici	D
Eseguire il test in doppio con raccolta simultanea del sudore non aumenta	C

significativamente il tempo impiegato per eseguire il test, né il disagio per il soggetto, ma diminuisce la % di fallimenti	
In risposta ad una richiesta di test del sudore, è sufficiente un solo test, a meno che i risultati suggeriscano un'anormalità nella raccolta o il sospetto di malattia	D
Il generatore deve essere alimentato a batteria e dovrebbe includere un blocco di sicurezza che limita la quantità di corrente a 5mA o meno. Il monitoraggio della corrente dovrebbe essere effettuato durante la ionoforesi, dove possibile. I sistemi Wescor® senza un amperometro hanno un blocco di sicurezza. L'operatore dovrebbe eseguire un controllo visivo dello stimolatore per rilevare eventuali danni o malfunzionamenti durante ogni uso. Le sicurezza elettrica di tutti gli stimolatori deve essere regolarmente testata da un elettricista e i rapporti di manutenzione devono essere conservati	D
Gli elettrodi dovrebbero essere di dimensione e curvatura tali da adattarsi comodamente all'arto del paziente: essi dovrebbero essere fermamente assicurati in posizione con delle fascette a strappo senza stringere troppo; gli elettrodi devono essere regolarmente puliti e ispezionati e buttati se mostrano buchi o irregolarità	D
La scelta di un nuovo equipaggiamento e il mantenimento dell'equipaggiamento esistente, devono essere conformi allo standard CPA (o standard equivalente)	D

NOTE

- Un singolo risultato di Laboratorio non è sufficiente a confermare o escludere la diagnosi di FC
- Bisogna promuovere l'esecuzione del test in doppio. Stante i numerosi rischi metodologici del test del sudore è opportuno favorire una maggiore sicurezza di qualità della fase preanalitica ed analitica mediante l'esecuzione in duplicato ed in siti cutanei differenti del test del sudore, almeno nelle fasce di pazienti a maggior rischio clinico o nei neonati con positività dello screening neonatale

Riferimenti normativi

- Direttiva 93/42/EEC - Official Journal of the EC N L169, 12/7/1993, p. 1
- Direttiva 2007/47/CE - Official Journal L 247, 21/09/2007 P. 0021 – 0055

(link a versioni in inglese ed in italiano: http://www.mediconingegneria.it/cert_med_links.html)

8.2.2 Soluzioni di elettroliti

Il test del sudore può essere eseguito con due metodi:

- il metodo Gibson-Cooke (vd. Appendice 2a delle LG inglesi) costituisce il metodo di riferimento raccomandato e consiste nella determinazione della concentrazione di ioni cloro o cloro e sodio nel sudore
- il metodo Wescor o conduttivimetrico (vd. Appendice 2b delle LG inglesi) necessita di ulteriori studi; i risultati ottenuti con questo metodo devono sempre essere confermati con il metodo Gibson-Cooke.

Ciascun metodo comporta la scelta di un determinato tipo di apparecchiature, di reagenti dedicati e impone di seguire una determinata procedura tecnica.

Soluzioni di elettroliti	Forza della raccomandazione
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	D
Le soluzioni contenenti cloro non devono essere usate per il rischio di contaminazione della raccolta	D
Soluzioni acide non tamponate non dovrebbero essere usate a causa dell'aumentato rischio di bruciature	C
Gli elettroliti usati per la iontoforesi devono o essere parte di un dispositivo medico (Es: dischi di pilogel Wescor®) o forniti da un produttore riconosciuto di prodotti medici "senza licenza". Le soluzioni NON devono essere prodotte da laboratori ospedalieri	D

NOTE

- Le dimensioni dei supporti per elettroliti devono essere almeno di 1 cm più grandi delle dimensioni degli elettrodi in tutte le direzioni, quindi \varnothing 4,8cm o 5,1x5,1cm
- Il nitrato di pilocarpina deve avere una concentrazione compresa tra 7,4 mmol/L e 18,4 mmol/L
- Usare soluzioni USP grade o equivalenti; al catodo è possibile usare anche soluzioni alternative, quali $MgSO_4$ 0,05mol/L o dischi di Pilogel Wescor®
- Usare solo dischi di Pilogel Wescor® integri
- Le soluzioni di pilocarpina nitrato, se non presenti in commercio, possono essere fornite solo da Laboratori di Farmacia Ospedaliera in quanto rientrano nella categoria dei "Preparati Galenici Magistrali"

Riferimenti normativi

- XII^a Edizione della Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, 2008 Istituto Superiore di Sanità (D.M. 03 Dicembre 2008)
- Aggiornamento e correzione della XII^a Edizione della Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, 2013 Istituto Superiore di Sanità (D.M. 26 Febbraio 2010)
- European Pharmacopoeia 9^a Edition (01 Gennaio 2017)

8.2.3 Iontoforesi

Iontoforesi: durata, corrente	Forza della raccomandazione
Quando le soluzioni di elettroliti sono applicate ai tamponi, si dovrebbe applicare una corrente di 1,5mA che viene poi aumentata gradualmente fino ad un massimo di 4mA. Raggiunti i 4mA, la corrente dovrebbe essere mantenuta per un minimo di 3 minuti fino ad un massimo di 5 minuti	D
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 e tempo e corrente sono controllati automaticamente da tutti i modelli in commercio	D
Per gli stimolatori Wescor® e C&IS Electronics Gibson-Cooke Power Supply il paziente deve essere tenuto sotto stretta osservazione durante la iontoforesi	D
Il sistema Wescor Nanoduct® non è raccomandato per la raccolta e l'analisi del sudore	D

NOTE

- Se gli elettrodi e l'epidermide non vengono puliti accuratamente con acqua bidistillata prima di ogni stimolazione, si rischia di ridurre l'efficacia della iontoforesi

8.2.4 Sicurezza

Sicurezza	Forza della raccomandazione
Nel caso si usino soluzioni di elettroliti, usare tamponi di adeguato spessore per minimizzare il rischio di bruciature	C
Sistemi ibridi come stimolati Wescor® o elettrodi con soluzioni di elettroliti o pilogel Wescor® con elettrodi non Wescor non dovrebbero essere usati poiché possono causare lesioni	D

NOTE

- E' importante garantire un fermo contatto tra epidermide e dischi di gel, anche per evitare ustioni

8.2.5 Mezzo di raccolta

Mezzo di raccolta	Forza della raccomandazione
Il sudore dovrebbe essere raccolto con carta da filtro pre-pesata o garza priva di cloro, approssimativamente delle stesse dimensioni dell'area di cute stimolata o con spirali Wescor®	D
La carta da filtro o la garza dovrebbe essere sigillata in posizione con materiale impermeabile come polietilene o parafilm e con nastro adesivo impermeabile. Occorre prestare attenzione affinché la sigillatura rimanga intatta per tutta la durata della raccolta	D
Durante la raccolta il sudore deve essere protetto da contaminazione, condensazione e evaporazione	D

NOTE

- Fare attenzione all'evaporazione del sudore soprattutto nella fase di trasferimento della carta/garza nel contenitore a chiusura ermetica dopo la raccolta

8.2.6 Tempo di raccolta

Tempo di raccolta	Forza della raccomandazione
Il sudore dovrebbe essere raccolto per non meno di 20 minuti (a meno che la spirale Wescor® si riempia prima) e non più di 30 minuti	C

Risultati Audit (2009)

L'88,8% (75,7% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati rispetta questi tempi di raccolta del sudore. Nessun Centro FC intervistato utilizza l'elettrodo Orion.

8.2.7 Rimozione del campione

Rimozione del campione	Forza della raccomandazione
Il sudore raccolto con spirale Wescor® deve essere rimosso bloccando l'estremità libera della spirale con una siringa o una pinza e tagliando l'altra estremità della spirale	D

8.2.8 Conservazione prima dell'analisi

Conservazione prima dell'analisi	Forza della raccomandazione
Durante la raccolta, il trasporto e l'analisi, si dovrebbe fare di tutto per minimizzare l'evaporazione del campione	D
Se fosse necessario conservare i campioni di sudore su carta da filtro prima dell'analisi, tenerli a 2-8°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	C
Il sudore liquido raccolto con spirale Wescor® può essere conservato nei contenitori sigillati della Wescor® o provette per PCR con tappo fino a 72 ore a 2-8°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	D
La conservazione fino a 72 ore a temperature più elevate dovrebbe essere effettuata in provette per PCR	C
Il sudore può essere raccolto in luoghi lontani e successivamente essere trasportato in Laboratorio per l'analisi, facendo attenzione ai dettagli relativi alla conservazione	D

Risultati Audit (2009)

Il 100% (90,9% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati conserva i campioni di sudore prima dell'analisi in accordo con le raccomandazioni internazionali.

8.2.9 Pesatura

Pesatura	Forza della raccomandazione
Usare sempre la stessa bilancia	D
Per pesare il sudore usare una bilancia con sensibilità pari a 0,0001 gr	D
Il sudore raccolto su carta da filtro dovrebbe essere pesato ed analizzato prima possibile	D

NOTE

- La fase di "pesatura" deve essere eseguita con strumentazione analitica idonea, con certificata e continua manutenzione, che ne identifichi i margini d'incertezza, stante il rilievo che la fase ha nel calcolo finale del risultato
- Lo stesso personale dovrebbe eseguire le 2 pesature
- Possono essere usate bilance con sensibilità pari a 0,001 gr

8.2.10 Definizione di campione adeguato

Definizione di campione adeguato	Forza della raccomandazione
La velocità di secrezione del sudore, intesa come velocità media calcolata durante il periodo di raccolta, non dovrebbe essere inferiore ad 1gr/m ² /min. Le raccolte con velocità di secrezione inferiore a questo valore non dovrebbero essere analizzate. Campioni di sudore insufficienti non devono essere raggruppati. Ripetere il test	D

NOTE

- La quantità minima di sudore raccomandata per raccolta su garza o carta da filtro è di 75mg
- Se la quantità di sudore >500mg, non procedere con l'analisi e ripetere il test del sudore in un altro momento

Risultati Audit (2009)

Il 96,2 (57,5% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati rispetta le quantità minime di sudore raccomandate. Il 100% (96,9% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati a fronte di un campione insufficiente, ripete il test per intero in un altro momento.

8.3 Fase Analitica

8.3.1 Eluizione del sudore

Eluizione del sudore dalla carta da filtro	Forza della raccomandazione
Quando il sudore viene raccolto su carta da filtro, il tempo di eluizione dovrebbe essere maggiore di 1 minuto e minore di 3 ore	C
Il campione di sudore raccolto su carta da filtro dovrebbe essere omogeneizzato e mescolato accuratamente prima dell'analisi	D
Il sudore raccolto con la spirale Wescor® deve essere accuratamente espulso e mescolato prima dell'analisi	D

NOTE

- Se il sudore viene raccolto su garza, agitare 1 minuto e lasciare a temperatura ambiente per 15 minuti
- Per l'eluizione del sudore da carta da filtro o garza è necessario usare acqua deionizzata
- Usare pipette volumetriche tarate
- E' possibile evitare l'eluizione, impiegando le spirali Wescor® o provette apposite in grado di separare e recuperare il sudore dalla garza, mediante centrifugazione

SCHEMA DI ELUIZIONE

Il volume di eluizione varia in base alla linearità e al limite di rilevamento del metodo analitico: "...ci sono molte poche evidenze su cui basare la miglior pratica. Se i Laboratori che raccolgono il sudore su carta da filtro o garza trattano il CQI in maniera appropriata, (cioè applicano il materiale di controllo su carta da filtro o garza) i risultati sul CQI daranno evidenza di una soddisfacente eluizione"...

8.3.2 Analiti

Analiti	Forza della raccomandazione
Si deve misurare la concentrazione di <u>cloro</u> nel sudore	B
La misura della conduttività da sola non è un test diagnostico adeguato per indagare la fibrosi cistica. La conduttività può essere usata come test di screening	D
Nei neonati sotto i 6 mesi di età la concentrazione del cloro nel sudore deve essere misurata anche se i livelli di conduttività sono normali	D
Nei neonati e nei bambini sopra i 6 mesi di età la concentrazione di cloro deve essere misurata se i livelli di conduttività sono intermedi o patologici	D
Le misure nel sudore di sodio, potassio, <u>osmolalità</u> non sono raccomandate	D

NOTE

- Bisogna promuovere la determinazione sia di cloro che di sodio: le due misure servono a validarsi a vicenda (una eccessiva differenza rende problematica l'attendibilità del test) Poi il rapporto Cl^-/Na^+ può essere un parametro utile: in FC questo è prevalentemente >1 . Negli adulti il rapporto ha una elevata sensibilità e una buona specificità
- La conduttività è la proprietà di una soluzione di condurre corrente e dipende dalla concentrazione e mobilità di tutti gli ioni presenti nel sudore ($\sim 15 \text{ mmol/L} > [Cl^-]$). Essa rappresenta una misura non selettiva degli ioni presenti in una soluzione
- L'osmolalità misura tutti i soluti presenti nel sudore

Risultati Audit (2009)

L'88,8% (75,7% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati dosa il cloro; il 100% dei Centri FC che dosa il sodio, lo dosa sempre insieme al cloro. Il 29,6% (39,3% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati misura la conduttività. Nessun Centro FC intervistato misura l'osmolalità.

8.3.3 Metodologia

Metodologia	Forza della raccomandazione
La colorimetria, la coulometria e i moduli ISE sono metodi soddisfacenti per il dosaggio del <u>cloro</u> nel sudore. Dove possibile, eseguire le analisi in doppio	D
La conduttività misurata con il sistema Wescor Sweat_Check è un metodo di analisi soddisfacente	D
Il sistema Wescor Nanoduct® non è attualmente raccomandato per la raccolta e l'analisi del sudore di routine	D

NOTE

- La [misura del cloro](#) è validata come **TEST DI CONFERMA**
- Per i moduli ISE, l'utilizzatore deve validare tale metodica per il dosaggio degli elettroliti su sudore
- La [misura della conduttività](#) eseguita solo con apparecchiature Wescor è approvata come **TEST DI SCREENING** dalla CFF solo all'esterno dei Centri di cura FC accreditati
- Non usare vecchi strumenti per misurare la conduttività
- Non usare test di lettura diretta in situ (elettrodo Orion)

Risultati Audit (2009)

Il 100% dei Centri FC intervistati utilizza i metodi raccomandati per il dosaggio del cloro, del sodio e per la misura della conduttività.

Riferimenti bibliografici

- Desax MC, Ammann RA, Hammer J, Schoeni MH, Barben J; Swiss Paediatric Respiratory Research Group. Nanoduct sweat testing for rapid diagnosis in newborns, infants and children with cystic fibrosis. Eur J Pediatr 2008;167(3):299-304
- Gonzalo-Ruiz J, Mas R, de Haro C, et al. Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat. Biosens Bioelectron 2009;24(6):1788-91
- Gonska T, Ip W, Turner D, et al. Sweat gland bioelectrics differ in cystic fibrosis: a new concept for potential diagnosis and assessment of CFTR function in cystic fibrosis. Thorax 2009;64(11):932-8
- Rose JB, Ellis L, John B, et al. Does the Macroduct (registered trademark) collection system reliably define sweat chloride concentration in subjects with intermediate results? Clin Biochem 2009;42(12):1260-4
- Mattar AC, Gomes EN, Adde FV, Leone C, Rodrigues JC. Comparison between classic Gibson and Cooke technique and sweat conductivity test in patients with and without cystic fibrosis. J Pediatr (Rio J) 2010;86(2):109-14
- Mastella G. Sweat testing: can the conductivity analysis take the place of the classic Gibson and Cooke technique? Pediatr (Rio J) 2010;86(2):89-91

- Cinel G, Dođru D, Yalçın E, Özçelik U, Gürçan N, Kiper N. Sweat conductivity test: can it replace chloride titration for cystic fibrosis diagnosis? *Turk J Pediatr* 2012;54(6):576-82
- Farahmand F, Sadjadei N, Haghi-Ashtiani MT, Modaresi V, Rezaei N, Pakseresht B. Comparison of classic sweat test and crystallization test in diagnosis of cystic fibrosis. *Iran J Pediatr* 2012;22(1):102-6
- Quinton P, Molyneux L, Ip W, et al. β -adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(8):732-9
- Laguna TA, Lin N, Wang Q, Holme B, McNamara J, Regelman WE. Comparison of quantitative sweat chloride methods after positive newborn screen for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2012;47(8):736-42
- Pullan NJ, Thurston V, Barber S. Evaluation of an inductively coupled plasma mass spectrometry method for the analysis of sweat chloride and sodium for use in the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem* 2013;50(Pt 3):267-70
- Sezer RG, Aydemir G, Akcan AB, et al. Nanoduct sweat conductivity measurements in 2664 patients: relationship to age, arterial blood gas, serum electrolyte profiles and clinical diagnosis. *J Clin Med Res* 2013;5(1):34-41
- Cohen-Cyberknoh M, Yaakov Y, Shoseyov D, et al. Evaluation of the intestinal current measurement method as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2013;48(3):229-35
- Wine JJ, Char JE, Chen J, et al. In vivo readout of CFTR function: ratiometric measurement of CFTR-dependent secretion by individual, identifiable human sweat glands. *PLoS One* 2013;8(10):e77114
- Mattar AC, Leone C, Rodrigues JC, Adde FV. Sweat conductivity: An accurate diagnostic test for cystic fibrosis? *J Cyst Fibros* 2014;13(5):528-33
- Ooi CY, Dupuis A, Gonska T, et al. Does integration of various ion channel measurements improve diagnostic performance in cystic fibrosis? *Ann Am Thorac Soc* 2014 May;11(4):562-70
- Rock MJ, Makhholm L, Eickhoff J. A new method of sweat testing: the CF Quantum® sweat test. *J Cyst Fibros* 2014;13(5):520-7
- Vernooij-van Langen A, Dompeling E, Yntema JB, et al. Clinical evaluation of the Nanoduct sweat test system in the diagnosis of cystic fibrosis after newborn screening. *Eur J Pediatr* 2015;174:1025-34
- Emiralioglu N, Ozcelik U, Yalcin E, et al. Diagnosis of cystic fibrosis with chloride meter (Sherwood M926S chloride analyzer) and sweat test analysis system (CFA collection system) compared to Gibson Cooke method. *Turkish J of Pediatr* 2016;58:27-3
- Faria AG, Marson FAL, de Souza Gomez CC, et al. Quality of sweat test (ST) based on the proportion of sweat sodium (Na) and sweat chloride (Cl) as diagnostic parameter of cystic fibrosis: are we on the right way? *Diagnostic Pathology* 2016;11:103

8.3.4 Modello di referto

Modello di referto	Forza della raccomandazione
Il referto dovrebbe riportare:	D
1) Identificazione completa del paziente	
2) richiedente ed indirizzo di consegna	
3) Data e ora del test, data e ora del referto	
4) Peso/volume del sudore raccolto	
5) Risultati analitici (mmol/L)	
5) Dovrebbe essere indicato in modo esplicito nel referto quale analita(i) è stato misurato(i): cloro, sodio conduttività. Indicare le ragioni se il test non viene eseguito o se non ci sono risultati disponibili	
6) Intervalli di riferimento	
7) Interpretazione dei risultati	

In Appendice A di questo documento è riportato un elenco di mutazioni/varianti associate a test del sudore negativo/borderline che possono anche causare quadri di fibrosi cistica e che, a parere del gruppo di lavoro, non giustificano un abbassamento della soglia del test del sudore a 30mEq/l per tutte le fasce di età, contrariamente a quanto suggerito dalla Consensus sui criteri diagnostici per fibrosi cistica pubblicata della CF Foundation nel 2017 (vd. § 6.2).

Risultati Audit (2009)

Il 100% dei Centri FC intervistati riporta nel referto l'identificazione completa del paziente; il 75% (55,1% nell'audit 2006) la data e l'ora del test; l'83,3% (48,2% nell'audit 2006) la data e l'ora del referto; l'83,3% (58,6% nell'audit 2006) il peso/volume di sudore raccolto; il 50% (20,6% nell'audit 2006) il peso/volume minimo accettabile; il 100% l'analita misurato; il 91,6% (82,7% nell'audit 2006) gli intervalli di riferimento analitici; il 58,3% (58,6% nell'audit 2006) l'interpretazione dei risultati.

Allegato

Contenuti minimi del referto

Allegato

Form referto test del sudore

Contenuti minimi del referto

- identificazione completa del paziente
- dichiarare se si tratta di un test di screening (metodo conduttivimetrico per il dosaggio dell'NaCl) o di un test di conferma (metodo di Gibson-Cooke per il dosaggio di cloro o cloro + sodio)
- data test
- data analisi
- data referto
- peso/volume sudore raccolto
- peso/volume minimo accettabile (75mg o 15uL)
- metodo stimolazione (iontoforesi pilocarpinica)
- analita misurato (cloro o cloro + sodio; conduttività)
- principio analitico (CLORO: coulometria, colorimetria, moduli ISE; SODIO: fotometro a fiamma, moduli ISE; equivalenti di NaCl: conduttività elettrica)
- intervalli di riferimento analitici suddivisi per fasce d'età (per CLORO e SODIO spostare il cut-off di normalità sotto i 6 mesi a 30mEq/L; per gli equivalenti di NaCl fissare a 50mmol/L il livello decisionale)
- interpretazione risultati (per CLORO e SODIO: concentrazione normale (≤ 29 o 39 mEq/L) con bassa probabilità di FC, concentrazione intermedia (compresa tra 40 e 59mEq/L), suggestiva ma non diagnostica per FC, concentrazione elevata (≥ 60 mEq/L) che supporta la diagnosi di FC; per gli EQUIVALENTI DI NaCl: oltre 50mmol/L richiedere il dosaggio del cloro)
- raccomandazioni per ripetere il test o indirizzare il paziente al Centro Specializzato in FC (in caso di valori borderline, patologici o negativi con persistenza dei sintomi suggestivi per fibrosi cistica indirizzare il paziente ad un Centro specializzato in FC)
- firma Responsabile di Laboratorio o Responsabile dell'analisi

Form Referto Test del Sudore

Logo Azienda/Laboratorio

Dati identificativi completi dal paziente:

[COGNOME, NOME][SESSO][DATA DI NASCITA][CODICE IDENTIFICATIVO][PROVENIENZA RICHIESTA]

Dati relativi al test:

[TEST DI SCREENING/TEST DI CONFERMA][DATA PRELIEVO][DATA ANALISI][DATA REFERTO]

Dati relativi alla procedura:

[METODO QUANTITATIVO DI Gibson e Cooke (iontoforesi pilocarpinica)]
[METODO CONDUTTIVIMETRICO (iontoforesi pilocarpinica)]

Dati relativi all'analita misurato:

[CLORO][CLORO e SODIO][EQUIVALENTI DI NaCl]

Dati relativi al principio analitico:

[dosaggio CLORO mediante: COULOMETRIA, COLORIMETRIA, MODULI ISE]
[dosaggio SODIO mediante: FOTOMETRO A FIAMMA, MODULI ISE]
[dosaggio EQUIVALENTI DI NaCl mediante: CONDUTTIVITA' ELETTRICA]

Dati relativi al campione:

[QUANTITA' DI SUDORE RACCOLTA][QUANTITA' DI SUDORE MINIMA ACCETTABILE]

Risultati:

CLORO e SODIO: concentrazione espressa in mEq/L o mmol/L
EQUIVALENTI DI NaCl: concentrazione espressa in mmol/L

Intervalli di riferimento analitici:

		<u>Età</u>	<u>Intervallo</u>	<u>Interpretazione</u>
CLORO e SODIO	fino a 6 mesi		≤29 mEq/L	normale, bassa probabilità di FC
			30-59 mEq/L	intermedia, suggestiva ma non diagnostica per FC
	oltre i 6 mesi		≥60 mEq/L	elevata, supporta la diagnosi di FC
			≤39 mEq/L	normale, bassa probabilità di FC
		40-59 mEq/L	intermedia, suggestiva ma non diagnostica per FC	
			≥60 mEq/L	elevata, supporta la diagnosi di FC
EQUIVALENTI DI NaCl			≤49 mmol/L	normale, bassa probabilità di FC
			≥50 mmol/L	elevata, confermare con dosaggio del cloro

Raccomandazioni:

indicare i motivi che spingono a richiedere un ulteriore test (campione insufficiente, valore intermedio o elevato, ecc.) o ad indirizzare il paziente presso un Centro specializzato in FC (per inquadramento clinico globale e/o dosaggio cloro e/o approfondimento diagnostico)

Firma:

del Responsabile di Laboratorio o Responsabile dell'analisi

8.3.5 Qualità

Qualità	Forza della raccomandazione
Il sudore che è stato soggetto a contaminazione e/o evaporazione non deve essere analizzato	C
Il range analitico dei metodi impiegati deve coprire gli intervalli di concentrazione dei soggetti normali e dei soggetti con fibrosi cistica	C
I metodi analitici devono essere ampiamente documentati come procedure operative standard (SOP) per uniformarsi allo standard CPA (Clinical Pathology Accreditation)(o standard equivalente)	
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	C
Il metodo analitico per misurare il cloro dovrebbe avere un CV tra batch del 5% (o meno) alla concentrazione di 40-50mmol/L	B
Il metodo analitico per la conduttività dovrebbe avere un CV tra batch del 2% (o meno) alla concentrazione di 50mmol/L	B
Il laboratorio deve partecipare ad uno schema di valutazione esterna di qualità appropriato	C
Risultati non fisiologici, cioè con cloro >150mmol/L, dovrebbero essere messi in discussione	B
Per la conduttività, si può usare un limite fisiologico superiore provvisorio di 170 mmol/L, in attesa di ulteriori evidenze	C

NOTE

- I risultati non fisiologici da mettere in discussione sono anche quelli in cui cloro e/o sodio sono <10mmol/L

I centri dovrebbero monitorare la % dei test ripetuti ed indagare ogni significativo aumento della % di fallimenti	D
Campioni di sudore non idonei (cioè, con peso o volume insufficiente) non dovrebbero superare il 10% dell'intera popolazione testata (escludendo i campioni ripetuti ed i test eseguiti su pazienti malati/troppo piccoli). Il target dovrebbe essere fissato al 5% nei bambini oltre 6 mesi di età	C
Nei bambini sotto i 6 mesi di età il numero di test falliti non dovrebbe superare il 20% dell'intera popolazione testata	C
La performance dell'intera procedura del test del sudore dovrebbe essere rivista con regolarità. Questo dovrebbe includere: 1) campioni insufficienti, registrati come % dei campioni totali e per operatore; 2) dati fuori controllo (% dei valori fuori dal range definito per il CQI); 3) performance nella verifica esterna di qualità	C
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	C

NOTE

- E' necessario analizzare campioni e controlli nella stessa maniera
- La differenza tra la concentrazione di sodio e di cloro misurate sullo stesso campione di sudore deve essere <15mmol/L
- Elevati valori di cloro o di NaCl in campioni di sudore inferiori a 75mg o 15uL possono essere dovuti ad aumentata concentrazione di sali nel campione di sudore, con volume/peso ridotto

Risultati Audit (2009)

Il 44,4% (45,4% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati dichiara di eseguire il controllo di qualità interno (CQI) in accordo con le raccomandazioni internazionali. Nessun Centro FC intervistato partecipa ad un programma di valutazione esterna di qualità (VEQ). Va in ogni caso tenuto conto che dal 2014 è in atto un programma di VEQ Italiano gestito dall'Istituto Superiore di Sanità a cui stanno partecipando un numero sempre crescente di laboratori/centri FC ed i cui risultati sono stati pubblicati.

Raccomandazioni per migliorare la raccolta del sudore (CLSI, 2009)

- Seguire le linee guida CLSI-34 A3 alla lettera
- Calcolare correttamente la percentuale (%) dei campioni insufficienti (CI). Il tasso di QNS corrisponde alla % di test del sudore con quantità di sudore insufficiente al primo tentativo
- Quando si esegue il test in doppio bilateralmente, il campione si definisce insufficiente solo se non si ottiene una quantità di sudore adeguata da entrambi i siti
- Limitare il numero di operatori che eseguono la raccolta di sudore a pochi professionisti ben formati. Ogni operatore dovrebbe eseguire almeno 1 raccolta a settimana per mantenere la competenza necessaria. Il Direttore di Laboratorio/Direttore di Centro deve verificare con regolarità la competenza di tutto il personale che esegue i test del sudore tramite osservazione diretta della prestazione
- Eseguire il test in doppio (cioè raccogliere ed analizzare il sudore da due siti). Mentre i campioni raccolti da due siti non possono essere mescolati per l'analisi, eseguire il test bilateralmente aumenta la probabilità di raccogliere un campione sufficiente da almeno un sito
- Verificare che il paziente sia ben idratato, senza patologia acuta e che i neonati asintomatici abbiano un peso corporeo di almeno 2 kg ed un'età di almeno 2 settimane
- Valutare periodicamente la strumentazione per la iontoforesi per la perdita di tensione e il controllo della corrente
- Per la iontoforesi usare il nitrato di pilocarpina, non la pilocarpina cloridrato
- Usare elettrodi di diametro 3.81x3.81cm e dischi di garza o carta da filtro di 5.1x5.1cm per stimolare indipendentemente dall'età o dalle dimensioni corporee del paziente
- Verificare che le aree di stimolazione e di raccolta siano delle stesse dimensioni
- Posizionare l'elettrodo positivo sulla superficie volare interna dell'avambraccio dove c'è una maggiore densità di ghiandole sudoripare
- Posizionare il dispositivo di raccolta o la carta o garza direttamente sull'area stimolata con l'elettrodo positivo
- Avvolgere l'area di raccolta con una benda elasticizzata per sicurezza
- Il riscaldamento termico del sito di raccolta non sembra aumentare la resa di sudore
- Raccogliere tutto il sudore condensato sulla superficie interna del parafilm quando si raccoglie il sudore con carta o garza
- Non conservare o trasportare il sudore nella spirale Macroduct poiché si può verificare l'evaporazione del campione
- Determinare con accuratezza la quantità di sudore raccolto sia con bilancia analitica sia con spirale Macroduct
- Redigere un programma di miglioramento continuo della qualità per monitorare periodicamente:
 - la formazione e la competenza degli operatori addetti sia alla raccolta che all'analisi
 - la performance nelle verifiche esterne di qualità
 - la % di QNS associata ad ogni operatore

Riferimenti bibliografici

- Legrys VA, McColley SA, Li Z, Farrell PM. The need for quality improvement in sweat testing infants after newborn screening for cystic fibrosis. *J Pediatr* 2010;157(6):1035-7
- Goldberg S, Schwartz S, Mimouni F, Stankiewicz H, Izbicki G, Picard E. Does sweat volume influence the sweat test results? *Arch Dis Child* 2010;95(5):377-81

- Kleyn M, Korzeniewski S, Grigorescu V, et al. Predictors of insufficient sweat production during confirmatory testing for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2011;46(1):23-30
- Nguyen-Khoa T, Borgard JP, Marchand M, et al. [Analytical quality of assays and comparison of procedures for the sweat test]. [Article in French] *Ann Biol Clin (Paris)* 2012;70(1):5-12
- Aqil B, West A, Dowlin M, et al. Implementation of a Quality Improvement Program to Improve Sweat Test Performance in a Pediatric Hospital. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(7):920-2
- Salvatore M, Florida G, Amato A, et al. The Italian pilot external quality assessment program for cystic fibrosis sweat test. *Clin Biochem.* 2016;49(7-8):601-5
- Salvatore M, Florida G, Amato A, et al. The Italian External Quality Assessment Program for CF Sweat Chloride Test: Results of the 2015 Round. *Journal of Chemistry and Biochemistry.* 2016; 4 (2):33-43

8.4 Fase Post-Analitica

8.4.1 Interpretazione degli elettroliti nel sudore

Interpretazione degli elettroliti nel sudore	Forza della raccomandazione
Per l'interpretazione sono raccomandate le seguenti definizioni:	
•una concentrazione di <u>cloro</u> nel sudore > 60 mmol/L supporta la diagnosi di FC	C
•una concentrazione di <u>cloro</u> nel sudore tra 40 e 60 mmol/L o, se età inferiore ai 6 mesi, 30-60 mmol/L, è intermedia e richiede ulteriori indagini per fibrosi cistica come ripetere il test e/o ulteriori indagini	C
•una concentrazione di <u>cloro</u> nel sudore < 40 mmol/L o, se età inferiore ai 6 mesi, < 30 mmol/L è normale ma richiede una correlazione genetica e clinica	C
Un valore di conduttività < 50 mmol/L è improbabile che sia associato con FC. Valori di conduttività > 90 mmol/L supportano una diagnosi di FC	C
La fibrosi cistica non dovrebbe essere diagnostica basandosi solamente sulla misura della conduttività. In tutti i pazienti con conduttività ≥ 50 mmol/L eseguire analisi del cloro e/o indagine genetica	C
Porre attenzione alla variabilità biologica intra-individuale quando si interpretano i risultati del test del sudore, in particolare per i valori vicini ai limiti di normalità. La variabilità biologica è molto maggiore dell'imprecisione analitica	D
I pazienti con valori di cloro nell'intervallo intermedio devono ricevere una valutazione clinica da parte di uno specialista in fibrosi cistica prima di ricevere un'etichetta diagnostica	D

SORGENTI DI ERRORE

La maggior parte degli errori alla base di risultati **falsi positivi** e **falsi negativi** è causata dall'uso di metodi non affidabili, da quantità di sudore inadeguate, da problemi tecnici, da una non corretta interpretazione dei risultati, da personale di Laboratorio senza esperienza e dall'assenza di procedure di assicurazione di qualità

NOTE

- Valutare sempre i risultati del cloro tenendo conto di andamento clinico ed età del paziente
- La **diagnosi di FC** è di competenza clinica e non dovrebbe **mai** essere **basata su un singolo test del sudore positivo**. Se l'indagine genetica conferma la diagnosi non è necessario eseguire il secondo test del sudore

- Un **singolo risultato** di Laboratorio **non è sufficiente a confermare** o ad **escludere** la **diagnosi di FC** se il risultato non correla con il fenotipo clinico e/o il genotipo
- Valori di cloro patologici in soggetti affetti da malattie metaboliche e/o malattie sistemiche che assumono terapie croniche per la malattia di base, devono essere interpretati escludendo l'interferenza da farmaci
- Nel valutare i risultati di test del sudore ripetuti nello stesso individuo tenere conto della variabilità biologica intra-individuale che può essere compresa tra il 20 e il 32%
- Gli intervalli di riferimento vengono corretti come segue: patologico $\geq 60\text{mmol/L}$; intermedio $40\text{-}59\text{mmol/L}$ ($30\text{-}59\text{mmol/L}$ < 6 mesi di età); $\leq 39\text{mmol/L}$ ($\leq 29\text{mmol/L}$ < 6 mesi di età)

Risultati Audit (2009)

Il 43,4% (56% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati che dosano il cloro utilizzano gli intervalli di riferimento raccomandati; il 12,5% (30,7% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati che dosa gli equivalenti di NaCl utilizza gli intervalli di riferimento raccomandati. Per il cloro sono in uso nei Centri FC intervistati 9 intervalli di riferimento differenti (10 nell'audit 2006); per il sodio sono in uso nei Centri FC intervistati 3 intervalli di riferimento differenti (4 nell'audit 2006); per gli equivalenti di NaCl sono in uso nei Centri FC intervistati 8 intervalli di riferimento differenti (7 nell'audit 2006). Il 3,7% dei Centri FC intervistati dosa gli equivalenti di NaCl come unico analita. Tutti i Centri FC che dosano il sodio non lo dosano come unico analita.

Riferimenti bibliografici

- Damas C, Saleiro S, Gomes I, Marques JA. Cystic fibrosis in adults. Rev Port Pneumol 2007;13(3):335-47
- Koerbin G, Greaves RF, Robins H, Farquhar J, Hickman PE. Total intra-individual variation in sweat sodium and chloride concentrations for the diagnosis of cystic fibrosis. Clin Chim Acta 2008;393(2):128-9
- Mackay RJ, Florkowski CM, George PM, Sies CW, Woods S. Uncertainty of sweat chloride testing: does the right hand know what the left hand is doing? Ann Clin Biochem 2008;45(pt 6):535-8
- Wilmott RW. Reference values for sweat testing. J Pediatr 2008;153(6):A1
- O'Sullivan BP, Zwerdling RG. By the Sweat of Our Brows: How Salty Should a Person Be? J Pediatr 2008;153(6):735-6
- Mishra A, Greaves R, Smith K, et al. Diagnosis of cystic fibrosis by sweat testing: age specific reference intervals. J Pediatr 2008;153(6):758-63
- Soultan ZN, Foster MM, Newman NB, Anbar RD. Sweat chloride testing in infants identified as heterozygote carriers by newborn screening. J Pediatr 2008;153(6):857-9
- Seia M, Costantino L, Paracchini V, et al. Borderline sweat test: utility and limits of genetic analysis for the diagnosis of cystic fibrosis. Clin Biochem 2009;42(7-8):611-6
- Jayaraj R, Barton PV, Newland P, et al. A reference interval for sweat chloride in infants aged between five and six weeks of age. Ann Clin Biochem 2009;46(1):73-8
- Guglani L, Sitwat B, Lower D, Kurland G, Weiner DJ. Elevated sweat chloride concentration in children without cystic fibrosis who are receiving topiramate therapy. Pediatr Pulmonol 2012;47(5):429-33
- Dal'Maso VB, Mallmann L, Siebert M, Simon L, Saraiva-Pereira ML, Dalcin Pde T. Diagnostic contribution of molecular analysis of the cystic fibrosis transmembrane

- conductance regulator gene in patients suspected of having mild or atypical cystic fibrosis. *J Bras Pneumol* 2013;39(2):181-9
- Traeger N, Shi Q, Dozor AJ. Relationship between sweat chloride, sodium, and age in clinically obtained samples. *J Cyst Fibros* 2014 Jan;13(1):10-4
 - Bonadia LC, de Lima Marson FA, Ribeiro JD, et al. CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene* 2014;540(2):183-90
 - Groves T, Robinson P, Fitzgerald DA. Question 7: For an infant with an equivocal sweat chloride following newborn screening, how likely is a diagnosis of cystic fibrosis? *Paediatr Respir Rev* 2016;20:48-50
 - Vermeulen F, Lebecque P, De Boeck K, Leal D. Biological variability of the sweat chloride in diagnostic sweat test: a retrospective analysis. *J Cyst Fibros* 2017;16(1):30-5
 - Tummler B. Variability of sweat chloride-a never ending story. *J Cyst Fibros* 2017;16(1):7-8
 - Bosch B, Bilton D, Sosnay P, et al. Ethnicity impacts the cystic fibrosis diagnosis: A note of caution. *J Cyst Fibros* 2017 Feb 20. pii: S1569-1993(17)30023-1. doi:10.1016/j.jcf.2017.01.016. [Epub ahead of print]
 - Farrell PM, White TB, Derichs N, Castellani C, Rosenstein BJ. Cystic Fibrosis Diagnostic Challenges over 4 Decades: Historical Perspectives and Lessons Learned. *J Pediatr* 2017;181S:S16-S26
 - Farrell PM, White TB, Howenstine MS. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Screened Populations. *J Pediatr* 2017;181S:S33-S44

Tabella

Elenco delle patologie con elettroliti nel sudore elevati (CLSI, 2009)

Elenco delle patologie con elettroliti nel sudore transientemente e modicamente elevati (CLSI, 2009)

Anoressia nervosa	Sindrome di Mauriac (malnutrizione di)
Dermatite atopica	Lupus eritematoso sistemico
Malattia celiaca (in fase di scompenso)	Deficit di triosofosfato isomerasi
Disfunzione autonoma	Pielonefrite
Privazione ambientale	Malattia di Hirschsprung
Colestasi familiare (malattia di Byler)	Malnutrizione calorico-proteica
Fucosidosi di tipo I	Pseudoipoadosteronismo
Malattia da accumulo di glicogeno Tipo I	Ritardo della crescita (psico-sociale)
Ipgogammaglobulinemia	Sindrome da cheratite, ittiosi, sordità (KID)
	Insufficienza surrenalica non trattata
	Ipotiroidismo non trattato

Nelle patologie sopra elencate il test del sudore può dare risultati di poco superiori ai livelli di normalità. Comunque, con poche eccezioni, queste patologie non rappresentano un problema nella diagnosi differenziale. Molti di questi case reports sono rappresentati da

pochi pazienti nei quali, una volta iniziata la terapia per la patologia specifica, i valori del test del sudore ritornano alla normalità.

Riferimenti bibliografici

- Brown SMN, Buchdahl R. Shwachman-Diamond syndrome in a child presenting with cystic fibrosis-type symptoms and a false-positive sweat test. *RJ Soc Med* 2008;101(Suppl 1):S39-43
- Esposito C, Sammarco G, De Fazio C, Alicchio F, Settini A. Another case of cystic fibrosis complicated by meconium ileus associated with Hirschsprung's disease: a Rare and important association. *Pediatr Surg Int* 2008;24(9):1069-71
- Jackson JA, Simon D, Greenbaum LA. False-positive sweat chloride test in a child with pyelonephritis in a single kidney. *Clin Pediatr (Phila)* 2009;48(6):683-5
- Awasthi S, Dixit P, Maurya N. Higher Sweat Chloride Levels in Patients with Asthma: A Case-Control Study. *Indian J Pediatr* 2015;82(2):114-8

8.4.2 Quando ripetere il test del sudore

Quando ripetere il test del sudore	Forza della raccomandazione
Si raccomanda di ripetere un test del sudore quando il risultato non correla con il fenotipo clinico e/o il genotipo	D

NOTE

- Tutti i valori di cloro positivi dovrebbero essere ripetuti e/o confermati con l'indagine genetica
- Tutti i valori di cloro intermedi dovrebbero essere ripetuti; se viene confermato un valore intermedio è opportuno eseguire ulteriori indagini (inclusi i test genetici) ed in caso di neonato selezionato per positività al programma di screening neonatale, favorire la tempestiva presa in carico presso il Centro Clinico di Riferimento
- Eseguire sempre il test del sudore nei fratelli e sorelle dei pazienti affetti

Riferimenti bibliografici

- Munck A, Houssin E, Roussey M. The importance of sweat testing for older siblings of patients with cystic fibrosis identified by newborn screening. *J. Pediatr* 2009;155(6):928-30

8.4.3 Ulteriori indagini

Nessuna raccomandazione

NOTE

- Riservare la misura NPD a casi rigorosamente selezionati con test del sudore e genetica non conclusivi. Questa indagine deve essere eseguita solo in Centri di riferimento riconosciuti e possibilmente accreditati per eseguire la misura NPD a scopo diagnostico
- Altre indagini utili sono: valutazione della funzionalità pancreatiche esocrina; valutazione dell'azoospermia; isolamento nell'escreato di ceppo mucoide di *Pseudomonas aeruginosa*; evidenza radiografica di pansinusite
- In presenza di valori del test del sudore borderline, positivi o negativi con persistenza dei sintomi che hanno portato all'esecuzione del test invio al Centro specializzato in FC per inquadramento generale ed ulteriori approfondimenti diagnostici

Riferimenti bibliografici

- Lebo RV, Omlor GJ. Targeted extended cystic fibrosis mutation testing on known and at-risk patients and relatives. *Genet Test* 2007;11(4):427-44
- Roussey M, Bihannic A, Scotet V, et al. Neonatal screening of cystic fibrosis: diagnostic problems with CFTR mild mutations. *J Inherit Metab Dis* 2007;30(4):613
- Yaakov Y, Kerem E, Yahav Y, et al. Reproducibility of nasal potential difference measurements in cystic fibrosis. *Chest* 2007;132(4):1219-26
- Mayell SJ, Munck A, Craig JV, et al; European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2009;8(1):71-8
- Gaillard D, Clavel C, Bessaci-Kabouya K, Abély M. Mild Cystic fibrosis: genetics – extending follow-up is necessary. *Arch Pediatr* 2009;16(4):387-90
- Coman T, Fajac I, Bienvenu T, et al. The diagnosis of cystic fibrosis in adults: lessons from a family story. *Rev Mal Respir* 2009;26(1):67-73
- Goubau C, Wilschanski M, Skalická V, et al. Phenotypic characterisation of patients with intermediate sweat chloride values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis. *Thorax* 2009;64(8):683-91
- Spinelli E, Seia M, Melotti P, Marchina E, Padoan R. CFTR mutation in an Arab patient: clinical and functional features of 875+1G>A/875+1G>A genotype. *J Cyst Fibros* 2009;8(4):282-4
- Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, et al. Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(79):929-36
- Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Roussel D, et al. Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax* 2010;65(6):539-44
- Bienvenu T, Sermet-Gaudelus I, Burgel PR, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(10):1078-84
- Boucher RC. Bronchiectasis: a continuum of ion transport dysfunction or multiple hits? *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(10):1017-9

- Valiulis A, Skurvydienė I, Misevičienė V, Kasnauskienė J, Vaidelienė L, Utkus A. Relevance of nasal potential difference in diagnosis of cystic fibrosis among children. *Medicina (Kaunas)* 2013;49(4):185-90
- Ooi CY, Dupuis A, Ellis L, et al. Does extensive genotyping and nasal potential difference testing clarify the diagnosis of cystic fibrosis among patients with single-organ manifestations of cystic fibrosis? *Thorax* 2014 Mar;69(3):254-60

8.5 Responsabilità

8.5.1 Responsabilità dell'esecuzione del test e della formazione

Responsabilità dell'esecuzione del test e della formazione	Forza della raccomandazione
E' probabile che la familiarità con la procedura e la frequenza della analisi influenzino la performance del test del sudore Per questo motivo non è accettabile per un'organizzazione o un individuo eseguire uno scarso numero di test ed è richiesta l'esecuzione di un numero sufficiente di test/anno per mantenere competenza e qualità	D
Il test del sudore deve essere eseguito da personale pienamente formato e con esperienza: la formazione dovrebbe essere pienamente documentata; la procedura dovrebbe essere documentata come una SOP (Standard Operating Procedure); dovrebbero essere attive appropriate procedure di rivalidazione	C
La raccolta del sudore può essere eseguita da varie figure professionali sanitarie	C
L'analisi del sudore dovrebbe essere eseguita da personale biomedico qualificato e esperto o da clinici pienamente formati con regolare validazione: formazione e validazione dovrebbero essere pienamente documentate	C
Un professionista di Laboratorio dovrebbe avere la responsabilità della formazione e verifica della competenza e rivalidazione di tutto lo staff che esegue i test del sudore	C
La responsabilità del test del sudore, sia le fasi di stimolazione e raccolta, sia la fase analitica, dovrebbe essere di un chimico clinico (o funzione equivalente) e dovrebbe essere chiaramente compresa da tutti gli operatori e utilizzatori; dovrebbe essere attivato e compreso da tutti gli operatori un meccanismo per riferire qualsiasi dubbio sulla performance del test	C

NOTE

- Ogni **Centro di Riferimento** o **Servizio di Supporto FC** dovrebbe eseguire **almeno 200 test/anno**. Nelle Regioni in cui non sia raggiungibile tale numerosità campionaria, il numero minimo di test/anno corrisponderà a quello del Centro di Riferimento Regionale
- Ogni **operatore** dovrebbe eseguire **almeno 50 test/anno**. Nelle Regioni in cui non sia raggiungibile tale numerosità campionaria, il numero minimo di test/operatore/anno corrisponderà a quello del Centro di Riferimento Regionale
- **IMPORTANTE**: il personale che esegue il test conduttivimetrico deve avere lo stesso livello di esperienza richiesto al personale che esegue il test di Gibson-Cooke

Risultati Audit (2009)

Nel 59,2% (51,6% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati le fasi di stimolazione e raccolta sono affidate a medici ed infermieri; nel 40,8% (48,4% nell'audit 2006) a tecnici e laureati di laboratorio. Solo nel 51,8% (42,4% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati la responsabilità dell'intero processo è a carico del Laboratorio. Nel 96,2% (90,9% nell'audit 2006) dei Centri FC intervistati si eseguono più di 50 test/anno e nel 96,2% (78,7% nell'audit 2006) ogni operatore esegue più di 10 test/anno.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Mishra A, Greaves R, Massie J. The limitations of sweat electrolyte reference intervals for the diagnosis of cystic fibrosis: a systematic review. *Clin Biochem Rev* 2007;28(2):60-76
2. Rowe SM, Accurso F, Clancy JP. Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in early-phase clinical trials. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(4):387-98
3. Southern KW, Munck A, Pollitt R, et al. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros* 2007;6(1):57-65
4. Green A. The sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis—a personal experience of guideline production. *Ann Clin Biochem* 2007;44(pt 1):20-4
5. Walters S, Mehta A. Epidemiology of cystic fibrosis. In: Hodson M, Geddes DM, Bush A, eds. *Cystic fibrosis*, 3rd Edn. London: Edward Arnold Ltd, 2007:21–45
6. Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Last update: 19 February 2008
7. Dalcin Pde T, Abreu E, Silva FA. Cystic fibrosis in adults: diagnostic and therapeutic aspects. *J Bras Pneumol* 2008;34(2):107-17
8. Festini F, Taccetti G, Repetto T, et al. Incidence of cystic fibrosis in the Albanian population *Pediatr Pulmonol* 2008;43(11):1124-9
9. Wilschanski M. Patterns of gastrointestinal disease associated with mutations of CFTR. *Curr Gastroenterol Rep* 2008;10(3):316-23
10. Paranjape SM, Zeitlin PL. Atypical cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;35(3):116-23
11. Cirilli N, Padoan R, Raia V; ICFS Sweat Test Working Group. Audit of sweat testing: a first report from Italian Cystic Fibrosis Centres. *J Cyst Fibros*. 2008 Sep;7(5):415-22
12. Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros* 2008;7(5):450–53
13. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis consensus report. *J Pediatr* 2008;153(2):S4-S14
14. Taylor CJ, Hardcastle J, Southern KW. Physiological measurements confirming the diagnosis of cystic fibrosis: the sweat test and measurements of transepithelial potential difference. *Paediatr Respir Rev* 2009;10(4):220-6
15. Barrio Gómez de Agüero MI, Garcìa Hernández G, Gartner S: Grupo de Trabajo de Fibrosis Quística. Protocol for the diagnosis and follow up of patients with cystic fibrosis. *An Pediatr (Barc)* 2009;71(3):250-64
16. Sifain M, Ren CL. Diagnosing cystic fibrosis at all ages. *Clinical Pulmonary Medicine* 2010;17(1):14-9
17. Hall E, Lapworth R. Use of sweat conductivity measurements. *Ann Clin Biochem* 2010;47(Pt 4):390-1
18. De Boeck K, Ashlock M. Introduction to Section I: the relevance of CF diagnostic tools for measuring restoration of CFTR function after therapeutic interventions in human clinical trials. *Methods Mol Biol* 2011;741:3-11

19. Ooi CY, Dupuis A, Ellis L, et al. Comparing the American and European diagnostic guidelines for cystic fibrosis: same disease, different language? *Thorax* 2012;67(7):618-24
20. Collie JT, Massie RJ, Jones OA, LeGrys VA, Greaves RF. Sixty-five years since the New York heat wave: advances in sweat testing for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2014;49(2):106-17

10. ALLEGATI

10.1 Elenco delle strutture di Laboratorio presso i Centri di Riferimento Regionale/Servizi di Supporto per la Fibrosi Cistica e Laboratori di Riferimento Regionale per lo Screening Neonatale in Italia dove si esegue il Test del Sudore

Elenco dei Centri di Riferimento Regionale/Servizi di Supporto per la Fibrosi Cistica e laboratori di Riferimento Regionale per lo Screening Neonatale in Italia dove si esegue il Test del Sudore

ABRUZZO

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
OSPEDALE SAN LIBERATORE
VIALE RISORGIMENTO
64032 ATRI

BASILICATA

C.R.R. PER LA FIBROSI CISTICA
A.O." S. CARLO" DIVISIONE PEDIATRIA
VIA POTITO PETRONE
85100 POTENZA

CALABRIA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
OSPEDALE "GIOVANNI PAOLO II"
VIA SENATORE ARTURO PERUGINI
88046 LAMEZIA TERME

CAMPANIA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
AZIENDA UNIVERSITARIA POLICLINICO FEDERICO II°
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI EDIFICIO N° 11A
VIA S. PANSINI, 5
80131 NAPOLI

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA ADULTI (*)
AZIENDA UNIVERSITARIA POLICLINICO FEDERICO II°
DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E PATOLOGIA CLINICA, CATTEDRA DI
GERIATRIA
VIA S. PANSINI 5
80131 NAPOLI

CENTRO REGIONALE SCREENING DELLE MALATTIE METABOLICHE
P.O. SS ANNUNZIATA
VIA EGIZIACA A FORCELLA, 18
80139 NAPOLI

EMILIA ROMAGNA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA
CLINICA PEDIATRICA
VIA GRAMSCI, 14
43100 PARMA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
OSPEDALE M. BUFALINI - AUSL CESENA
PEDIATRIA E PATOLOGIA NEONATALE
VIALE GHIROTTI, 286
47023 CESENA (FO)

FRIULI VENEZIA GIULIA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
IRCSS MATERNO-INFANTILE BURLO GAROFOLO
PEDIATRIA
VIA DELL'ISTRIA, 65/1
34100 TRIESTE

LAZIO

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
UNIVERSITÀ LA SAPIENZA POLICLINICO UMBERTO I°
CLINICA PEDIATRICA
VIALE REGINA ELENA, 324
00161 ROMA

CENTRO FIBROSI CISTICA
OSPEDALE BAMBINO GESÙ

PADIGLIONE GIOVANNI PAOLO II
PIAZZA S. ONOFRIO, 4
00165 ROMA

LIGURIA

LABORATORIO PER LO STUDIO DEGLI ERRORI CONGENITI DEL METABOLISMO
ISTITUTO G. GASLINI CLINICA PEDIATRICA I
LARGO G. GASLINI, 5
16100 GENOVA

LOMBARDIA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
CLINICA PEDIATRICA "G. E D. DE MARCHI", FONDAZIONE IRCCS CÀ GRANDA,
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
VIA DELLA COMMENDA 9
20122 MILANO
E LABORATORIO GENETICA MEDICA
FONDAZIONE IRCCS CA'GRANDA, OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
VIA COMMENDA, 12
20122 MILANO

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA ADULTI (*)
FONDAZIONE IRCCS CA'GRANDA, OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
VIA FRANCESCO SFORZA 35, PADIGLIONE SACCO
20122 MILANO

C.R.S. CENTRO REGIONALE DI SUPPORTO FIBROSI CISTICA
AZIENDA OSPEDALIERA SPEDALI CIVILI DI BRESCIA
PIAZZALE SPEDALI CIVILI 1
25123 BRESCIA

LABORATORIO DI RIFERIMENTO REGIONALE PER LO SCREENING NEONATALE
OSPEDALE DEI BAMBINI "V. BUZZI" – ASST FATEBENEFRATELLI SACCO
VIA CASTELVETRO N° 24
20154 MILANO

MARCHE

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
A.O.U. OSPEDALI RIUNITI
SOSD FIBROSI CISTICA
VIA CONCA, 71
60126 TORRETTE DI ANCONA

MOLISE

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
OSPEDALE CARDARELLI
CONTRADA TAPPINO
86100 CAMPOBASSO

PIEMONTE-VALLE D'AOSTA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
SEDE OSPEDALE REGINA MARGHERITA
PNEUMOLOGIA PEDIATRICA
PIAZZA POLONIA, 94
10126 TORINO

SEDE OSPEDALE "S. LUIGI" (*)
CLINICA UNIVERSITARIA
DIVISIONE DI PNEUMOLOGIA
REGIONE GONZOLE, 10
10043 ORBASSANO (TO)

PUGLIA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA PEDIATRIA "B. TRAMBUSTI"
E
U.O.C. GENETICA MEDICA/SETTORE LABORATORIO FIBROSI CISTICA E SCREENING
NEONATALE
AZIENDA UNIVERSITARIA/OSPEDALIERA CONSORZIALE – POLICLINICO
PIAZZA GIULIO CESARE, 11
70124 BARI

S.S. SERVIZIO DI SUPPORTO FIBROSI CISTICA
OSPEDALE "G. TATARELLA" DI CERIGNOLA
STRUTTURA COMPLESSA DI MEDICINA INTERNA
VIA XX SETTEMBRE
71042 CERIGNOLA (FG)

SARDEGNA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTTU
STRUTTURA COMPLESSA DI PEDIATRIA
PIAZZALE RICCHI, 1
09134 CAGLIARI

SICILIA

C.R.R. SERVIZIO PER LA DIAGNOSI E LA CURA
DELLA FIBROSI CISTICA
OSPEDALE DEI BAMBINI "G. DI CRISTINA"
VIA DELLE BENEDETTINE
90134 PALERMO

S.S. SERVIZIO DI SUPPORTO
POLICLINICO UNIVERSITARIO
UNITÀ OPERATIVA DI FC E GASTROENTEROLOGIA PEDIATRICA
ISTITUTO CLINICA PEDIATRICA
VIA CONSOLARE VALERIA, 1
98100 MESSINA

S.S. SERVIZIO DI SUPPORTO FIBROSI CISTICA
POLICLINICO UNIVERSITARIO
ISTITUTO DI CLINICA PEDIATRICA
VIA S. SOFIA, 78
95123 CATANIA

TOSCANA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA MEYER
VIALE PIERACCINI 24
50139 FIRENZE

S.S. SERVIZIO DI SUPPORTO FIBROSI CISTICA
OSPEDALE DELLA MISERICORDIA
VIA CIMABUE 109
58100 GROSSETO

S.S. SERVIZIO DI SUPPORTO FIBROSI CISTICA (*)
ASL 6 LIVORNO
VIALE ALFIERI, 36
57126 LIVORNO

TRENTINO-ALTO ADIGE

S.S. SERVIZIO DI SUPPORTO FIBROSI CISTICA
OSPEDALE S. MARIA DEL CARMINE, UNITÀ OPERATIVA DI PEDIATRIA
PIAZZALE S. MARIA 6
38068 ROVERETO
38068 ROVERETO (TN)

UMBRIA

C.R.R. CENTRO FIBROSI CISTICA
 PRESIDIO OSPEDALIERO DI GUBBIO E GUALDO TADINO
 PIAZZA UNITÀ D'ITALIA
 06024 BRANCA GUBBIO (PG)

VENETO

C.R.R. CENTRO REGIONALE VENETO
 AZIENDA OSPEDALIERA-UNIVERSITARIA INTEGRATA DI VERONA
 PIAZZALE STEFANI, 1
 37126 VERONA

S.S. SERVIZIO DI SUPPORTO FIBROSI CISTICA (*)
 OSPEDALE "S. MARIA DI CA' FONCELLO"
 PIAZZA OSPEDALE 1
 31100 TREVISO

(*) TUTTI I CENTRI FC CHE RIPORTANO QUESTO ASTERISCO NON ESEGUONO IL TEST DEL SUDORE NELLA LORO SEDE, MA PRESSO IL CENTRO REGIONALE FIBROSI CISTICA DI COMPETENZA TERRITORIALE

10.2 Appendice A: elenco mutazioni/varianti note che possono essere associate a test del sudore negativo/borderline

Di seguito l'elenco di queste mutazioni/varianti suddivise tra quelle che causano FC e quelle con conseguenze cliniche variabili. Dati derivati da: CFTR2 (1), <http://www.genet.sickkids.on.ca>(2), www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/(3)

Mutazioni che causano FC	Varianti con conseguenze cliniche variabili
c.3718-2477C>T (3849+10kbC>T)(1),	c.3208C>T (R1070W)(1)
c.2491G>T (E831X)(1)	c.3454G>C (D1152H)(1)
c.1654C>T (Q552X)(1)	c.350G>A (R117H)(1)
c.617T>G (L206W)(1)	c.[1210-12[5];1210-34TG[12]] 5T;TG12(1)
c.1055G>A (R352Q)(1)	c.3353C>T (S1118F)(2)(3)
c.2834C>T (S945L)(1)	c.1658G>A (R553Q)(2)(3)
c.349C>T (R117C)(1)	c.445G>A (G149R)(2)(3)
c.274G>A (E92K)(1)	c.926C>A (A309D)(2)
c.941G>A G314E(2)(3)	c.14C>T (P5L)(2)(3)

Le mutazioni sono classificate secondo GenBank Accession NM_000492.3

Nomenclatura: Cystic Fibrosis Mutation Database: www.genet.sickkids.on.ca. In parentesi le mutazioni secondo la nomenclatura tradizionale (legacy)

(1) List of current CFTR2 variants. 17 March 2017

(2) <http://www.genet.sickkids.on.ca>

(3) www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar

c.3353C>T (S1118F)(2)(3).

1. Zhang ZR, McDonough SI, McCarty NA. Interaction between permeation and gating in a putative pore domain mutant in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biophysical Journal*. 2000;79(1):298-313
2. Penmatsa H, Frederick CA, Nekkcalapu S, Conoley VG, Zhang W, Li C, Kappes J, Stokes DC, Naren AP. Clinical and molecular characterization of S1118F-CFTR. *Pediatr Pulmonol*. 2009 Oct;44(10):1003-9

(rs146521846 Clinical Significance not provided)

c.1658G>A (R553Q) (2)(3)

1. Tümmler B, Stanke F, Bronsveld I, Veeze H, Ballmann M. Transient correction of the basic defect in sweat glands in an individual with cystic fibrosis carrying the complex CFTR allele F508del-R553Q. *Thorax*. 2009 Feb;64(2):179-80

(rs121909044 Complex allele)

c.445G>A (G149R) (2)(3)

1. Mercier B, Verlingue C, Lissens W, Silber SJ, Novelli G, Bonduelle M, Audrézet MP, Férec C. Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients. *Am J Hum Genet*. 1995 Jan;56(1):272-7

(rs397508718 Clinical Significance not provided)

c.926C>A (A309D)(2)

Padoan R, Bassotti A, Seia M, Corbetta C. Negative sweat test in hypertrypsinaemic infants with cystic fibrosis carrying rare CFTR mutations. *Eur J Pediatr*. 2002 Apr;161(4):212-5

(rs not found)

c.941G>A G314E(2)(3)

1. Stanke F, Ballmann M, Bronsveld I, Dörk T, Gallati S, Laabs U, Derichs N, Ritzka M, Posselt HG, Harms HK, Griese M, Blau H, Mastella G, Bijman J, Veeze H, Tümmler B. Diversity of the basic defect of homozygous CFTR mutation genotypes in humans. *J Med Genet*. 2008 Jan;45(1):47-54

(rs57563344 Clinical Significance not provided)

c.14C>T (P5L)(2)(3)

2. Spicuzza L, Sciuto C, Di Dio L, Mattina T, Leonardi S, del Giudice MM, La Rosa M. Mild cystic fibrosis in patients with the rare P5L CFTR mutation. *J Cyst Fibros*. 2012 Jan;11(1):30-3
3. Playford MP, Nurminen E, Pentikäinen OT, Milgram SL, Hartwig JH, Stossel TP, Nakamura F. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with multiple immunoglobulin domains of filamin A. *J Biol Chem*. 2010 May 28;285(22):17156-65
4. Gené GG, Llobet A, Larriba S, de Semir D, Martínez I, Escalada A, Solsona C, Casals T, Aran JM. N-terminal CFTR missense variants severely affect the behavior of the CFTR chloride channel. *Hum Mutat*. 2008 May;29(5):738-49.

(rs193922501 Conflicting interpretations of pathogenicity)

Riferimenti bibliografici

- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7(3):179-96
- Stanke F, Ballmann M, Bronsveld I, et al. Diversity of the basic defect of homozygous CFTR mutation genotypes in humans. *J Med Genet* 2008;45(1):47-54
- Conklin L, Zeitlin PL, Cuffari C. Cystic fibrosis presenting as recurrent pancreatitis in a young child with a normal sweat test and pancreas divisum: a case report. *J Med Care Reports* 2008;23(2):176
- Tummler B, Stanke F, Bronsveld I, Veeze H, Ballmann M. Transient correction of the basic defect in sweat glands in an individual with cystic fibrosis carrying the complete CFTR allele F508del_R553Q. *Thorax* 2009;64(2):179-80