

Traduzione italiana curata da:

Dr.ssa Natalia Cirilli - Centro Fibrosi Cistica Ancona

Dr. Pietro Ragno - Centro Fibrosi Cistica Lamezia Terme

Dr.ssa Valeria Raia - Centro Fibrosi Cistica Napoli

Dr.ssa Manuela Seia - Laboratorio Genetica Medica – IRCCS Cà Granda, Policlinico Mangiagalli, Milano

Dr.ssa Cinzia Spaggiari - Centro Fibrosi Cistica Parma

Dr.ssa Antonella Angiolillo - Centro Fibrosi Cistica Campobasso, Università del Molise

# **Linee guida per l'esecuzione del Test del Sudore per l'indagine di Fibrosi Cistica in UK v.2 Seconda Versione**

**(Queste linee guida sostituiscono le linee guida del 2003)**

**Linee guida basate sull'evidenza**

**Marzo 2014**



## **RINGRAZIAMENTI**

Il gruppo è grato a tutti gli ordini professionali per la sponsorizzazione di queste linee guida, ai revisori e agli altri esperti per i loro utili commenti e suggerimenti nella realizzazione di queste nuove linee guida che sono nate grazie ad un programma di revisione della pubblicazione originale.

### **Contatti:**

**Corrispondenza a**

**Dr Sarah Heap, Consultant Paediatric Biochemist**

**Birmingham Children's Hospital,  
Steelhouse Lane,  
BIRMINGHAM,  
B4 6NH.**

**Tel: (0121) 333 9922**

**Fax: (0121) 333 9911**

**Email: sarah.heap@bch.nhs.uk**

**Parole chiave: Test del sudore  
Fibrosi Cistica**

**Linee guida per il test del sudore: [www.acb.org.uk](http://www.acb.org.uk)**

## ABBREVIAZIONI

ACB	Association for Clinical Biochemistry & Laboratory Medicine
BTS	British Thoracic Society
CPA	Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd.
CFNG	Cystic Fibrosis Nurses Group
CFT	Cystic Fibrosis Trust
IBMS	Institute of Biomedical Science
CLSI	US Clinical and Laboratory Standards Institute
NBS	Newborn Screening
NEQAS	National External Quality Assurance Schemes
NCFSB	Neonatal Cystic Fibrosis Screening Board
RCPATH	Royal College of Pathologists
RCPCH	Royal College of Paediatrics and Child Health
SOP	Standard Operating Procedure
UKNSPC	UK Newborn Screening Programme Centre
WAG	Welsh Assembly Government

# CONTENUTI

	Pagina
<b>Gruppo di sviluppo delle linee guida</b>	<b>6</b>
<b>Consultazione e revisione da parte di pari</b>	<b>8</b>
<b>Organizzazioni stakeholder</b>	<b>10</b>
<b>Note per gli utilizzatori</b>	<b>11</b>
<b>Revisione e aggiornamento</b>	<b>12</b>
<b>Riassunto delle Raccomandazioni</b>	<b>13</b>
<b>Report delle linee guida</b>	
<b>Introduzione</b>	<b>23</b>
<b>Obiettivo</b>	<b>25</b>
<b>Scopo</b>	<b>25</b>
<b>Convenzione sulla presentazione delle linee guida</b>	<b>27</b>
<i><b>Evidenze e Raccomandazioni</b></i>	
<b>1. Quali informazioni è necessario fornire al paziente?</b>	<b>27</b>
<b>2. Per quali pazienti è indicato un test del sudore?</b>	<b>28</b>
<b>3. Come si dovrebbe raccogliere il sudore?</b>	<b>31</b>
<b>4. Come dovrebbe essere analizzato il sudore?</b>	<b>43</b>
<b>5. Quali sono i requisiti di qualità per il test del sudore?</b>	<b>50</b>
<b>6. Quali valori di riferimento e commenti interpretativi dovrebbero essere utilizzati?</b>	<b>58</b>
<b>7. Chi ha la responsabilità del test e della formazione?</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>69</b>
<b>Processo di revisione delle linee guida</b>	
<b>Metodologia</b>	<b>81</b>
<b>Classificazione delle Evidenze e Raccomandazioni</b>	<b>84</b>
<b>Schema di classificazione delle Raccomandazioni</b>	<b>84</b>
<b>Revisione sistematica</b>	<b>87</b>
<b>Implicazioni attese delle nuove linee guida</b>	<b>90</b>
<b>Allegati</b>	
<b>1. Foglio informativo sul test del sudore (Cystic Fibrosis Trust)</b>	<b>92</b>
<b>2. Esempi di procedure operative standard</b>	

<b>(a) Wescor Macroduct®</b>	<b>94</b>
<b>(b) Raccolta su carta da filtro secondo Gibson e Cooke</b>	<b>101</b>
<b>3. Calcolo della percentuale media del sudore durante il tempo di raccolta</b>	<b>109</b>

## GRUPPO DI SVILUPPO DELLE LINEE GUIDA

### Membri del gruppo per lo sviluppo delle linee guida

**Dr Sarah Heap**, Consultant Paediatric Biochemist (Chair), Birmingham Children's Hospital NHS Foundation Trust, Birmingham

**Mr Paul Griffiths**, Consultant Biochemist, Birmingham Children's Hospital NHS Foundation Trust, Birmingham. (RCPATH)

**Professor Stuart Elborn**, Consultant Chest Physician, Belfast City Hospital, Belfast (BTS, CFT)

**Miss Beverley Harris**, Principal Biochemist, Royal United Hospital, Bath (ACB)

**Mrs Avril Wayte**, Principal Biochemist, Ysbyty Gwynedd, Bangor (WAG)

**Dr. Colin E. Wallis**, Consultant Paediatric Respiratory Physician, Great Ormond Street Hospital, London (RCPCH)

**Dr. Peter Weller**, Consultant Respiratory Physician, Birmingham Children's Hospital NHS Foundation Trust, Birmingham (RCPCH, BPRS, NCFBS)

**Mr. F Mackenzie**, Wolfson EQA Laboratory, Birmingham (UKNEQAS)

**Miss Anne Sheldrake**, Laboratory Manager, Great Ormond Street Hospital, London (IBMS)

**Mrs Wendy Nixon**, Cystic Fibrosis & Respiratory Nurse Specialist, Birmingham Children's Hospital NHS Foundation Trust, Birmingham (CFNG)

**Dr David Lacy**, Consultant Paediatrician, Wirral University Teaching Hospital NHS Foundation Trust, Wirral

Tutti i membri del gruppo per lo sviluppo delle linee guida hanno reso dichiarazioni di interesse ed ulteriori dettagli in merito sono disponibili su richiesta. Nessun conflitto di interesse è stato dichiarato.

## **Finanziamenti**

Il gruppo di sviluppo delle linee guida desidera ringraziare gli ordini professionali/organizzazioni che hanno contribuito alle spese di viaggio durante la realizzazione di questa revisione delle linee guida, tra cui:

Association for Clinical Biochemistry & Laboratory Medicine (finanziamenti ricevuti durante la precedente revisione delle linee guida)

Birmingham Children's Hospital NHS Foundation Trust

Institute of Biomedical Science

North West Wales NHS Trust

## CONSULTAZIONE E REVISIONE DA PARTE DI PARI

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

La prima bozza delle linee guida è stata stesa in un incontro aperto a tutti i rappresentanti dei gruppi professionisti/pazienti il 15 Giugno del 2009. Commenti e nuove evidenze emerse da questo incontro sono stati successivamente presi in considerazione dal gruppo di lavoro in una riunione il 15 Giugno del 2009, anche in seguito ad ulteriori ricerche in letteratura

### **ii) Web**

La bozza delle linee guida è stata resa disponibile sui seguenti siti web a Febbraio/Marzo 2011:

Association for Clinical Biochemistry

Il Royal College of Pathologists ha comunicato ai membri la disponibilità delle linee guida con un l'invito ad inviare un commento

UKNEQAS

### **iii) Consultazione**

Le opinioni delle parti interessate non facenti parte del gruppo di lavoro sono state sollecitate facendo circolare la bozza delle linee guida a:

Wescor® Inc.,

(An Elitech Group Company)

370 W 1700 S

LOGAN,

Utah 84321,

U.S.A.

C&S Electronics Inc

2565 16th Avenue

Columbus

NE 68601,

USA



Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd.,  
21 – 47 High Street,  
Feltham,  
Middlesex,  
TW13 4UN.

I commenti emersi durante questo periodo di consultazione sono stati affrontati dal presidente del gruppo di lavoro in consultazione con i membri del gruppo. Il gruppo di lavoro ha raggiunto un consenso per ogni commento.

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

Le linee guida sono state revisionate da un gruppo di esperti indipendenti. I commenti sono stati affrontati dal gruppo di lavoro ad un meeting successivo al periodo di consultazione e un accordo è stato raggiunto riguardo cambiamenti ed emendamenti. La bozza delle linee guida è stata modificata in seguito ai suggerimenti dei revisori.

I revisori erano:

Jean Kirk, Consultant Clinical Scientist, Edinburgh, UK

Kevin Southern, Reader and Honorary Consultant in Paediatric Respiratory Medicine, Liverpool, UK

Helen Aitkenhead, Principal Clinical Scientist, London, UK

Heather Wheatley, Senior Biomedical Scientist, Cardiff, UK

Sarah Davie, Clinical Scientist, Kingston upon Thames, UK

Mike McKean, Consultant in Respiratory Paediatrics, Newcastle upon Tyne, UK

Jeremy Hull, Consultant in Paediatric Respiratory Medicine and Honorary Senior Lecturer, Oxford, UK

Eamonn O'Driscoll, Chief Biomedical Scientist, Cambridge, UK

Charlotte Dawson, Cystic Fibrosis Clinical Nurse Specialist, London, UK

Lisa Shelley, Lay Member, CF Trust, UK

Marijke Proesmans, Consultant Pediatric Pulmonology, Leuven, Belgium

Ronda Greaves, Senior Lecturer, Victoria, Australia

Lisa Shelley è genitore di un bambino con diagnosi di fibrosi cistica e ha commentato le linee guida dal punto di vista della “popolazione target”.

## **ORGANIZZAZIONI STAKEHOLDER**

Per la bozza delle linee guida sono state consultate le seguenti organizzazioni:

Association for Clinical Biochemistry & Laboratory Medicine

British Paediatric Respiratory Society

British Thoracic Society

Cystic Fibrosis Nurses Group

Cystic Fibrosis Trust

Institute of Biomedical Science

National External Quality Assurance Schemes

Neonatal Cystic Fibrosis Screening Board

Royal College of Pathologists Royal College of Paediatrics and Child Health

Welsh Assembly Government

## NOTE PER GLI UTILIZZATORI

È inteso che le raccomandazioni contenute in questa seconda versione aggiornata delle linee guida saranno impiegate per uso locale nel Regno Unito ovunque venga eseguito il test del sudore per l'indagine della fibrosi cistica.

Le linee guida sono rivolte al seguente personale coinvolto nel percorso diagnostico della fibrosi cistica attraverso il test del sudore:

personale di laboratorio (assistenti di laboratorio medico, ricercatori biomedici, ricercatori clinici e patologi chimici)

medici che richiedono il test e forniscono assistenza al paziente

personale infermieristico coinvolto nell'assistenza al paziente

È importante ci siano confronti tra tutti gli operatori sanitari interessati (chimici clinici, pediatri, pneumologi, infermieri specializzati in fibrosi cistica e ricercatori biomedici), di modo che specifiche linee guida locali possano essere ricavate e attuate.

Le linee guida appartengono agli organismi professionali elencati nella pagina del titolo, ma possono essere copiate per uso locale. Il presidente del gruppo di revisione delle linee guida detiene la responsabilità editoriale delle linee guida.

Per dettagli su come reperire delle copie, contattare:

Dr Sarah Heap, Consultant Biochemist

Department of Blood Sciences - Clinical Chemistry,  
Birmingham Children's Hospital,  
Steelhouse Lane,  
Birmingham,  
B4 6NH.

Email: [sarah.heap@bch.nhs.uk](mailto:sarah.heap@bch.nhs.uk)

## REVISIONE E AGGIORNAMENTO

Queste linee guida sono state pubblicate dal Gruppo di Lavoro sotto forma di bozza inizialmente nel Gennaio 2011 e, in forma definitiva, nel 2014, dopo l'inserimento di commenti derivanti dalla valutazione formale del Royal College of Paediatrics and Child Health.

Quando la classificazione di una raccomandazione è stata cambiata in seguito alla valutazione del processo, questo è evidenziato.

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

Si prevede di rivedere le linee guida nel 2020.

Sono graditi commenti per migliorare il processo di revisione e tutti i suggerimenti possono essere inviati a:

Dr Sarah Heap, Consultant Biochemist

Birmingham Children's Hospital,  
Steelhouse Lane,  
Birmingham,  
B4 6NH.  
Email: sarah.heap@bch.nhs.uk

## RIASSUNTO DELLE RACCOMANDAZIONI

### 1. Quali informazioni è necessario fornire al paziente?

- Il consenso informato dovrebbe essere redatto in accordo con il protocollo locale.
- È buona pratica clinica preparare efficacemente il paziente e, dove opportuno, i genitori prima del test, fornendo informazioni appropriate. Queste dovrebbero comprendere le ragioni per cui il test viene eseguito, come sarà effettuato, i rischi associati al test, cosa proverà il paziente e i dettagli relativi a chi contattare per il test e il risultato finale. In allegato 1 viene fornito un foglio informativo per i pazienti/genitori. In particolare, per i neonati identificati dallo screening neonatale, il foglio informativo “UKNSPC Sospetta FC” potrebbe essere visualizzato attraverso il loro sito web<sup>(140)</sup>

[Grado D]

### 2. Per quali pazienti è indicato un test del sudore?

- Il test del sudore può essere eseguito dopo 2 settimane di vita nei neonati con peso superiore ai 2Kg al momento del test, normalmente idratati e senza malattie sistemiche [Grado C]
- Il test del sudore può essere effettuato nei neonati a termine dopo 7 giorni di vita se clinicamente rilevante, ma sarà necessario ripeterlo se viene raccolta una quantità di sudore insufficiente [Grado C]
- Il test del sudore dovrebbe essere rimandato nei soggetti edematosi, in trattamento con topiramato o che ricevano 9-alfa-fludrocortisone per via sistemica [Grado D]
- Il test del sudore dovrebbe essere rimandato nei soggetti disidratati, sottopeso, sistematicamente indisposti o che presentino un eczema che influenzi la stimolazione del sito di raccolta [Grado D]
- Il test del sudore può essere eseguito nei soggetti in trattamento con flucloxacillina [Grado C]
- Il test del sudore non dovrebbe essere eseguito in soggetti in O<sub>2</sub> terapia con sistema aperto (compreso il casco) Questo non si riferisce al bambino in O<sub>2</sub> terapia con occhiali nasali o maschera facciale [Grado D]

#### 2.1 Quando includere il test del sudore nello screening neonatale (NBS)?

- Il test del sudore è un'indagine chiave per la conferma della FC dopo un test di screening neonatale positivo [Grado C]

- Il test del sudore successivo allo screening neonatale dovrebbe essere effettuato in laboratori competenti nell'eseguire test in pazienti con meno di 3 mesi di età [Grado D]
- I risultati del test del sudore per i neonati identificati nel programma NBS dovrebbero essere disponibili alla prima visita medica [Grado D]

### **3. Come si dovrebbe raccogliere il sudore?**

#### **3.1 Quali siti dovrebbero essere utilizzati per la raccolta del sudore?**

- La superficie flessoria di entrambi gli avambracci è la sede preferita per la raccolta del sudore. Si possono prendere in considerazione altre sedi, ad esempio la parte superiore del braccio o della coscia, se entrambe le braccia sono eczematose, troppo piccole o non idonee per altre ragioni. [Grado D]

##### **3.1.1 Come si può evitare la contaminazione del sudore?**

- Per evitare contaminazione è importante porre attenzione a tutte le fasi della procedura, (vedi Allegati, ad esempio Procedure di Operazione Standard, SOP). Per detergere la pelle non usare soluzioni che contengano cloruri, né applicare gel anestetico locale [Grado D]

##### **3.1.2 Quante raccolte di sudore bisogna effettuare?**

- Eseguire il test del sudore bilateralmente non aumenta significativamente il tempo impiegato, né il disagio per il paziente, ma diminuisce la percentuale di errore [Grado C]
- In risposta ad una richiesta di test del sudore è sufficiente realizzare una sola raccolta di sudore a meno che i risultati non suggeriscano una irregolarità nella raccolta o il test è sospetto [Grado D]

### **3.2 Quali metodi e attrezzature sono appropriati per la stimolazione del sudore?**

#### **3.2.1 Quale alimentatore e quali elettrodi dovrebbero essere utilizzati?**

- Il generatore di corrente utilizzato deve essere alimentato a batteria e dovrebbe includere un dispositivo di sicurezza che limiti la quantità di corrente uguale o minore a 5mA
- Durante la iontoforesi si deve monitorare la corrente, ove possibile. I sistemi Wescor® senza un amperometro sono a corrente limitata con un adeguato sistema di sicurezza
- L'operatore, ad ogni utilizzo, dovrebbe sorvegliare l'alimentatore per eventuali danni o malfunzionamenti. La sicurezza elettrica del generatore di corrente deve essere periodicamente verificata da un elettricista e le registrazioni conservate [Grado D]
- Gli elettrodi dovrebbero essere di dimensione e curvatura tali da adattarsi comodamente all'arto del paziente:
  - essi dovrebbero essere fermamente assicurati in posizione, ma non così strettamente legati da impedire la circolazione.

- essi dovrebbero essere regolarmente puliti e controllati ed eliminati se mostrano buchi o irregolarità [Grado D]
- La scelta di una nuova attrezzatura e la manutenzione di quella esistente deve essere conforme al Clinical Pathology Accreditation, CPA (o standard equivalente) [Grado D]

### **3.2.2 Quali soluzioni elettrolitiche possono essere utilizzate?**

- È raccomandato l'uso ad entrambi gli elettrodi, di soluzioni acquose o dischetti di gel Wescor® contenenti nitrato di pilocarpina a 2-5 g/L. Soluzioni alternative (ad esempio solfato di magnesio) possono essere usate al catodo [Grado D]
- Le soluzioni contenenti cloruri non devono essere usate per non contaminare la raccolta del sudore [Grado D]
- Soluzioni acide non tamponate non dovrebbero essere usate in quanto aumentano il rischio di bruciature [Grado C]
- Gli elettroliti usati per la iontoforesi devono essere parte di un kit (ad esempio dischetti Wescor®Pilogel™) o forniti da un produttore accreditato di prodotti medici. Le soluzioni NON devono essere preparate in proprio da laboratori ospedalieri [Grado D]

### **3.2.3 Quale corrente dovrebbe essere usata per la iontoforesi e per quanto tempo?**

- Quando le soluzioni elettrolitiche sono applicate ai tamponi, si dovrebbe fornire una corrente iniziale di 1,5 mA, 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 [Grado D]
- Quando si usa il sistema Wescor®, bisognerebbe seguire le raccomandazioni del produttore in merito alla corrente e al tempo di stimolazione. Questi parametri variano a seconda del modello usato, ma sono controllati automaticamente dai modelli attuali [Grado D]
- Per gli alimentatori Wescor® e C&IS Electronics Gibson–Cooke il paziente deve essere tenuto sotto stretta osservazione durante tutto il periodo della iontoforesi [Grado D]
- Il Wescor Nanoduct® non è raccomandato per la stimolazione e l'analisi del sudore [Grado D]

### **3.2.4 Quali norme di sicurezza devono essere osservate durante la iontoforesi?**

- Per le soluzioni elettrolitiche devono essere utilizzati dei tamponi adeguatamente spessi per minimizzare il rischio di ustioni da acidi [Grado C]
- I sistemi ibridi, ad esempio alimentatore o elettrodi Wescor® con soluzioni acquose elettrolitiche, oppure dischetti di gel Wescor® con elettrodi non Wescor®, non dovrebbero essere usati in quanto potrebbero causare danno [Grado D]

### **3.3 Quale mezzo di raccolta dovrebbe essere utilizzato e per quanto tempo dovrebbe essere raccolto il sudore?**

#### **3.3.1 Quale mezzo di raccolta dovrebbe essere utilizzato?**

- Il sudore dovrebbe essere raccolto su carta pre-pesata priva di cloro o su garza, di dimensioni approssimativamente uguali alla superficie dell'area stimolata (i.e. tamponi usati nella iontoforesi) o in raccoglitori monouso WescorMacroduct® [Grado D]
- La carta da filtro o la garza devono essere mantenute in posizione sigillando con del materiale impermeabile quale polietilene o parafilm e nastro adesivo impermeabile. Bisogna fare attenzione che il tutto resti in sede durante la raccolta [Grado D]
- Qualsiasi metodo venga utilizzato durante la raccolta, il sudore deve essere preservato da contaminazioni, nonché dalla condensazione e dall'evaporazione (vedi esempio nelle Procedure Operative Standard, allegati 2a e 2b) [Grado D]

#### **3.3.2 Per quanto tempo dovrebbe essere raccolto il sudore?**

- Il sudore dovrebbe essere raccolto per non meno di 20 minuti (a meno che il tubicino Macroduct non si sia riempito prima) e non più di 30 minuti [Grado C]

#### **3.3.3 Come dovrebbe essere rimosso il dispositivo Macroduct®?**

- La raccolta con il dispositivo Macroduct® dovrebbe terminare chiudendo l'estremità libera del tubo con una siringa o un morsetto e tagliando all'altezza del Macroduct® [Grado D]

### **4. Come dovrebbe essere analizzato il sudore?**

#### **4.1 Quali aspetti preanalitici devono essere presi in considerazione?**

##### **4.1.1 Come dovrebbero essere conservati i campioni prima dell'analisi?**

- Durante la raccolta, il trasporto e l'analisi del sudore, bisogna minimizzare l'evaporazione del campione [Grado D]
- In caso sia necessario conservare i campioni di sudore raccolti su carta prima dell'analisi, essi dovrebbero essere tenuti a 4°C per un massimo di 3 giorni, in contenitori di opportune dimensioni e sigillati in modo da non consentire perdite o evaporazione [Grado C]
- Il sudore raccolto con il dispositivo Macroduct® può essere conservato sia nei tubicini Macroduct® sigillati, che in provette per PCR tappate, fino a 72 ore a 4°C. Vanno bene anche i capillari da ematocrito sigillati con plastilina, stando attenti a mantenere un po' d'aria tra il sudore e la plastilina [Grado D]
- La conservazione del sudore fino a 72 ore a temperature più elevate dovrebbe essere effettuata in provette per PCR tappate [Grado C]. Il sudore può essere raccolto in luoghi



distanti e trasportato in laboratorio per l'analisi, facendo attenzione alle norme di conservazione [Grado D]

#### **4.1.2 Come dovrebbe essere determinato il peso/volume del sudore?**

- Usare sempre la stessa bilancia [Grado D]
- Per pesare il sudore usare una bilancia con sensibilità 0,0001 g [Grado D]
- Il sudore raccolto su carta dovrebbe essere pesato ed analizzato il prima possibile [Grado D]

#### **4.1.3 Quando un campione è conforme?**

- La velocità di secrezione del sudore, intesa come velocità media calcolata durante il periodo di raccolta, non dovrebbe essere inferiore ad  $1\text{g}/\text{m}^2/\text{min}$ . Raccolte al di sotto di questo valore non dovrebbero essere analizzate. Campioni insufficienti non devono essere uniti tra loro, ma l'intero test del sudore deve essere ripetuto. [Grado D]

#### **4.2 Come si dovrebbero preparare i campioni di sudore per l'analisi?**

- Quando il sudore viene raccolto su carta da filtro (sezione 3.2.1) il tempo di eluizione dovrebbe essere maggiore di 1 minuto e inferiore a 3 ore [Grado C]
- I campioni raccolti su carta da filtro dovrebbero essere omogeneizzati e miscelati con cura prima dell'analisi [Grado D]
- I campioni raccolti utilizzando il sistema WescorMacroduct® devono essere accuratamente rimossi e miscelati prima dell'analisi [Grado D]

#### **4.3 Quali analiti devono essere dosati nel sudore per la diagnosi della FC?**

- Il cloro è l'analita di elezione [Grado B]
- La sola misura della conduttività del sudore non è un adeguato test diagnostico per l'indagine della FC. La conduttività dovrebbe essere utilizzata come test di screening [Grado D]
- Nei neonati al di sotto dei 6 mesi di età, la concentrazione di cloro nel sudore deve essere misurata anche se i livelli di conduttività sono normali [Grado D]
- Nei neonati e nei bambini al di sopra dei 6 mesi di età, la concentrazione di cloro deve essere misurata se si ottengono livelli di conduttività borderline o positivi [Grado D]
- Le misure di sodio/potassio/osmolalità nel sudore non sono raccomandate [Grado D]

#### **4.4 Quale metodologia deve essere utilizzata per il dosaggio?**

##### **4.4.1 Quali metodi sono disponibili per il dosaggio del cloro?**

- La colorimetria, la coulometria e i moduli ISE sono metodi soddisfacenti per il dosaggio del cloro nel sudore. Se possibile, si dovrebbe effettuare l'analisi in duplicato del cloro [Grado D]

##### **4.4.2 Quali metodi sono disponibili per la misura della conduttività?**

- La misura della conduttività usando l'analizzatore Wescor Sweat-Chek® è un metodo di analisi soddisfacente [Grado D]
- Il WescorNanoduct® non è attualmente raccomandato per la raccolta e l'analisi di routine del sudore [Grado D]

#### **4.5 Come compilare il referto?**

Il modello di referto dovrebbe riportare:

- Identificazione completa del paziente  
Richiedente e indirizzo di consegna
- Data e ora del test, data e ora del referto
- Risultati dell'analisi (mmol/L)  
Sul referto bisogna specificare quali analita(i) sono stati dosati  
i.e. cloro  
conduttività  
motivazione per la mancata esecuzione/ottenimento dei risultati
- Intervalli di riferimento (vedi sezione 6)
- Interpretazione dei risultati (vedi sezione 6)

[Grado D]

### **5. Quali sono i requisiti di qualità per il test del sudore?**

#### **5.1 Il sudore deve essere analizzato se sono sospettate contaminazioni o evaporazione?**

- Il sudore soggetto ad evaporazione e/o contaminazioni non deve essere analizzato [Grado C]

#### **5.2 Quali considerazioni dovrebbero essere fatte nella scelta del metodo analitico?**

- Il range analitico del metodo impiegato deve coprire gli intervalli di concentrazione dei soggetti normali e dei soggetti con fibrosi cistica [Grado C]
- I metodi analitici devono essere ampiamente riconosciuti come procedure operative standard (SOPs) conformi al Clinical Pathology Accreditation, CPA (o standard equivalente).

#### **5.3 Quale Controllo di Qualità Interno (IQC) bisogna usare?**

- Ci deve essere un controllo interno di qualità (diverso dalla procedura di calibrazione/standardizzazione) a due concentrazioni (normale e intermedia o patologica) per ciascuna analisi [Grado C]

##### **5.3.1 Quale imprecisione può essere raggiunta per il dosaggio del cloro?**

- Il metodo usato per il dosaggio del cloro dovrebbe avere un CV tra batch del 5% (o meno) alla concentrazione di 40-50 mmol/L [Grado B]

### **5.3.2 Quale imprecisione può essere raggiunta per la misura della conduttività?**

- Il metodo usato per la misura della conduttività dovrebbe avere un CV tra batch del 2% (o meno) alla concentrazione di 50 mmol/L [Grado B]

### **5.4 Quali considerazioni bisogna fare per la valutazione esterna di qualità (EQA)?**

- Il laboratorio deve partecipare ad un appropriato programma di valutazione esterna di qualità [Grado C]

### **5.5 Quali sono i limiti superiori previsti per le concentrazioni di cloro e di conduttività?**

- Risultati non fisiologici dovrebbero essere messi in discussione, i.e. cloro >150mmol/L, [Grado B]
- Per la conduttività si può usare un limite fisiologico superiore provvisorio di 170 mmol/L, in attesa di ulteriori evidenze [Grado C]

### **5.6 Quali sono i tassi di fallimento accettabili?**

- I centri dovrebbero monitorare il tasso di ripetizione e indagare su qualsiasi aumento significativo nella percentuale di fallimento [Grado D]
- Campioni di sudore non idonei (i.e. con peso o volume insufficiente) non dovrebbero superare il 10% della popolazione testata (escludendo i campioni ripetuti e quelli eseguiti su pazienti malati o molto piccoli). Si dovrebbe fissare una soglia inferiore al 5% nei bambini al di sopra dei 6 mesi di età [Grado C]
- Nei bambini al di sotto dei 6 mesi di età, i campioni di sudore non idonei non dovrebbero superare il 20% della popolazione testata [Grado C]

### **5.7 Come si dovrebbe valutare la prestazione?**

- L'esecuzione del test del sudore dovrebbe essere rivista con regolarità. Questo dovrebbe includere:
  - raccolte insufficienti - calcolate come % dei test totali per operatore;
  - percentuale di fallimento dell'analisi (i.e. % dei valori fuori dal range definito per il QC);
  - performance nella valutazione esterna di qualità [Grado C]
- Il laboratorio dovrebbe collaborare con continuità con i clinici per verificare i risultati del test del sudore, in particolare i campioni ripetuti, le diagnosi e l'esito dei risultati positivi e intermedi (vedi sezione 8) [Grado C]

## **6. Quali sono i valori di riferimento e ed I commenti interpretativi da usare?**

### **6.1 Quali sono i valori di riferimento e ed I commenti interpretativi da usare per le diverse concentrazioni di Cloro?**

- Una concentrazione di cloro nel sudore >60 mmol/L è consistente con una diagnosi di fibrosi cistica [Grado C]
- Una concentrazione di cloro nel sudore tra 40 - 60 mmol/L o tra 30- 60 mmol/L per età inferiore ai 6 mesi è un valore borderline che richiede ulteriori accertamenti come ad esempio un test di ripetizione e / o di ulteriori indagini [Grado C]
- Una concentrazione di cloro nel sudore < 40 mmol/L (o <30 mmol/L per età inferiore ai 6 mesi) rende poco probabile la diagnosi di Fibrosi Cistica ma il risultato deve essere correlato all'analisi genetica ed alla clinica [Grado C]

#### **6.2 Quali sono i valori di riferimento e ed I commenti interpretativi da usare per il test del sudore in conduttività?**

- Un valore < 50 mmol/L (equivalenti di NaCl) è improbabile che sia associato con FC. Valori > 90 mmol/L supportano una diagnosi di FC [Grado C]
- La fibrosi cistica non dovrebbe essere diagnostica basandosi solamente sulla misura della conduttività. E' necessaria una conferma diagnostica con la determinazione del Cloro o con l'analisi genetica in tutti i pazienti con valori conduttivi metrici uguali o superiori a 50mmol/L (Vedere sezione 4.3.3) [Grado C]

#### **6.3 Quale dono le variazioni biologiche intra-individuali degli analiti determinati dal test del sudore?**

- E' importante prendere in considerazione la variazione biologica intra-individuale al momento dell'interpretazione del test del sudore in particolare per i valori borderline. La variazione biologica intra-individuale è un fattore molto importante di imprecisione analitica [Grado D]

#### **6.4 In che modo i valori borderline correlano con il genotipo?**

- I pazienti con valori di test del sudore borderline necessitano di valutazioni cliniche prima di essere diagnosticati come malati [Grado D]

#### **6.5 Quali altre malattie genetiche sono associate alle mutazioni nel gene CFTR?**

- Nessuna raccomandazione

#### **6.6 Quali altre malattie genetiche o condizioni sono associate a valori aumentati di Cloro nel sudore?**

- Nessuna raccomandazione

#### **6.7 Quando ripetere il test del sudore?**

- Si raccomanda di ripetere un test del sudore quando il risultato non correla con il fenotipo clinico e/o il genotipo [Grado D]

#### **6.8 Quali ulteriori indagini possono essere intraprese per diagnosticare la fibrosi cistica?**

- Nessuna raccomandazione

### **7. Chi è responsabile dell'esecuzione del test e della formazione?**

### **7.1 Chi deve eseguire il test del sudore - Quali competenze sono richieste e quali sono le esigenze di formazione?**

- Il test del sudore deve essere eseguito da personale pienamente formato perchè le procedure ed il numero possono influire sulle prestazioni. Per questo motivo non è accettabile eseguire pochissimi test del sudore e la raccolta di un sufficiente numero annuo è necessario per mantenere la competenza e la qualità [Grado D]
- Il test del sudore deve essere eseguito da personale pienamente formato
  - la formazione dovrebbe essere pienamente documentata
  - la procedura dovrebbe essere documentata come una SOP (standard operating procedure)
  - appropriate procedure di rivalidazione dovrebbero essere attive

[Grado C]
- La raccolta del sudore può essere eseguita da varie figure professionali [Grado C]
- L'analisi del sudore dovrebbe essere eseguita da personale biomedico qualificato ed esperto o da clinici pienamente formati con regolare validazione:
  - le schede di formazione di validazione dovrebbero essere pienamente documentate

[Grado C]

### **7.2 Chi è responsabile delle analisi e della formazione?**

- Un chimico clinico (o funzione equivalente) dovrebbe avere la responsabilità della formazione e verifica della competenza e della rivalidazione di tutto lo staff che esegue i test del sudore [Grado 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 compreso 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 [Grado C]

## REPORT DELLE LINEE GUIDA

### INTRODUZIONE

#### Background/esigenza di una linea guida

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

Le manifestazioni tipiche o classiche dell'infezione respiratoria e dell'insufficienza pancreatica esocrina con elevata concentrazione di elettroliti nel sudore sono dovute alle mutazioni del gene della CFTR (cistic fibrosis transmembrane conductance regulator) sul cromosoma 7. Oltre 1800 mutazioni in questo locus sono associate con FC e con altri disordini correlati al CFTR. <sup>(154)</sup>

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

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

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

Nella maggior parte dei pazienti FC con caratteristiche tipiche e mutazioni identificate, il test del sudore è diagnostico. Nell'FC atipica, dove le mutazioni FC sono state identificate, il test del sudore può risultare intermedio, ma è di solito utile per formulare la diagnosi <sup>(5,6)</sup>

La diagnosi di FC può rimanere incerta in quei pazienti con caratteristiche cliniche suggestive e test del sudore intermedio e mutazioni non identificate. Molto raramente il test del sudore è normale in un paziente con genotipo FC <sup>(7,8,9)</sup>.

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

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

Queste evidenze hanno stimolato lo Special Advisory Group for Paediatric Investigations dello UK NEQAS a istituire uno schema di verifica esterna di qualità per l'analisi del sudore e la necessità di linee guida per l'esecuzione del test del sudore. Queste sono state prodotte nel 2003 e pubblicate da RCPCH e ACB <sup>(150, 151 152 153)</sup>.

### **La necessità di una revisione**

Le prime linee guida relative al test del sudore per la fibrosi cistica sono state pubblicate nel 2003 <sup>(141)</sup>, elaborate mediante un processo avviato dal 2000.

Dal 2003 abbiamo assistito ad un'espansione globale dei protocolli di screening neonatali per Fibrosi Cistica ed è stata prodotta numerosa letteratura.

Inoltre l'implementazione della tecnologia ha anche reso possibile l'introduzione dei sistemi conduttivimetrici in un certo numero di centri da cui emerge la necessità di un commento più dettagliato in merito e revisione.

Le Linee guida prodotte nel 2003 sono state formulate sulla base di revisione della letteratura e di opinioni da parte di esperti. Gli utenti della linea guida sono stati incoraggiati a rivedere criticamente il contenuto, ma anche di intraprendere un controllo locale al fine di aumentare la base di dati per la successiva revisione <sup>(151)</sup>. Secondo i criteri di approvazione RCPCH sono state identificate delle criticità, tra cui i criteri di ricerca informatizzata (è stato cercato solo Medline), una mancanza di evidence based medicine e, infine, la mancanza del rappresentante genitore/paziente durante la stesura delle Linee Guida. Questi problemi sono stati affrontati nel 2005, la seconda versione è iniziata nel 2008 e conclusa nel 2014.

Le questioni sollevate sono state affrontate soprattutto all'interno del gruppo di lavoro responsabile della redazione della linea guida esteso ad altri professionisti che svolgono un fondamentale ruolo nel test del sudore, per esempio, IBMs e CF infermieri.

## **OBIETTIVO**

Rivedere e aggiornare le linee guida del 2003 su come eseguire il test del sudore per diagnosticare la fibrosi cistica nel Regno Unito

## **SCOPO**

La revisione delle linee guida riguarda i successivi aspetti del test del sudore e anche se i contenuti sono invariati rispetto all'originale sono state ampliate per includere l'utilizzo di screening neonatale.

Le linee guida sono applicate a soggetti di tutte le età dai neonati, bambini, adolescenti e adulti

Tuttavia, la linea guida è principalmente orientata verso la popolazione pediatrica, in cui viene effettuata la maggioranza dei test

### **Informazione al paziente**

#### **Idoneità del soggetto**

- fisiologia
- stato clinico
- esclusioni/restrizioni
- screening neonatale

#### **Raccolta del sudore**

- sito di raccolta
- metodi di stimolazione e strumentazione
- mezzo di raccolta/tempo/contenitori

#### **Analisi del sudore**

- fattori pre-analitici
- pesatura
- eluizione
- analiti
- metodi analitici
- referto



## **Qualità**

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

## **Valori di riferimento e interpretazione**

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

## **Responsabilità dell'esecuzione del test e formazione del personale**

- Responsabilità
- chi può eseguire il test del sudore?
- competenza e formazione

## CONVENZIONE SULLA PRESENTAZIONE DELLE LINEE GUIDA

La linea guida sono organizzate in modo tale che le dichiarazioni rappresentano il corpo del testo con il livello generale di evidenza incluso tra parentesi (Livello di evidenza 1 ++ - 4).

Il livello globale di evidenza è stato formulato in seguito alla recensione delle evidenze singole e successiva identificazione di livelli di evidenze generali. La classificazione si basa su SIGN 2000 <sup>(137)</sup> ed è ulteriormente dettagliata nella classificazione delle prove [gradi] e Raccomandazioni.

Tutte le raccomandazioni sono presentate in grassetto seguite dalle dichiarazioni evidenza insieme con la classificazione in maiuscolo tra parentesi (Grado A-D) sulla base dei livelli di evidenza da cui la raccomandazione sono prese.

La classificazione si basa su SIGN 2000 <sup>(137)</sup> ed è ulteriormente dettagliata in classificazione delle prove e raccomandazioni.

### 1. Informazioni al paziente

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

Una recente inchiesta tra i genitori in merito alla consulenza al momento del test del sudore al termine del protocollo di screening neonatale per la fibrosi cistica ha scoperto che essi valutano una importante risorsa l'opuscolo informativo <sup>(11)</sup>. Un'altra indagine tra genitori condotta in un contesto generale di ambulatorio pediatrico, dove veniva fornito un opuscolo informativo prima di un test del sudore, ha mostrato i genitori valutano positivamente l'opuscolo informativo <sup>(10)</sup>. E' importante che i genitori abbiano la possibilità di porre domande dopo la lettura del foglio informativo (Livello di evidenza 3)

A Febbraio del 2006 è stata effettuato un audit delle linee guida del test del sudore in UK <sup>(12)</sup>. 73 laboratori hanno restituito i questionari; di questi 59 hanno sostenuto, in conformità con le linee guida, di fornire adeguate informazioni pre-test.

Le schede informative sono considerate una buona pratica clinica di erogazione delle informazioni anche se sono stati identificati i seguenti limiti:

- pazienti/genitori potrebbero essere in una situazione o ambiente di difficoltà per assimilare la informazioni

- il personale che ha la responsabilità di distribuire il foglio con le informazioni può non essere in grado di rispondere ad eventuali domande sollevate dal paziente/parente
- difficoltà linguistiche (Livello di evidenza 4)

Ai genitori dei bambini identificati come 'sospetti' selezionati dallo screening neonatale dovrebbe essere consegnato un opuscolo informativo elaborato da UKNSPC (UK Programma del Centro Screening Neonatale) specifico per questi casi che comprende informazioni sul test del sudore <sup>(140)</sup>. L'opuscolo è stato preparato dal team di Ricerca a supporto dei genitori (Istituto di Istruzione, Londra), che lavorano in UK per il Centro Screening Neonatale.

Ed è il prodotto di una riunione del gruppo di lavoro, avvenuta a novembre 2004, con i genitori e la CF Trust.

#### **Raccomandazioni**

- Il consenso informato dovrebbe essere redatto in accordo con i protocolli locali
- E' buona pratica clinica preparare efficacemente il paziente e, dove appropriato, il genitore prima del test fornendo informazioni appropriate. Le informazioni da fornire prima del test dovrebbero almeno comprendere le ragioni per cui il test viene eseguito, come viene eseguito, i rischi associati al test, cosa prova il paziente durante il test e dettagli relativi chi contattare per il test e per i risultati finali. Viene fornito un volantino di esempio per i pazienti/parenti (vd. Appendice 1 ) ed inoltre è possibile scaricare dal sito UKNSPC l'opuscolo specifico ai neonati "sospetti FC" identificati dai protocolli di screening neonatale <sup>(140)</sup>.

[Grado D]

## **2. Condizioni del paziente**

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

- I neonati pre termine non sudano nei primi 7-14gg dopo la nascita, ma molti neonati a termine sudano fin dal primo giorno <sup>(1)</sup> (Livello di evidenza 2+)
- Nei neonati a termine il contenuto di sodio (e cloro) può essere elevato nei primi 7 gg dopo la nascita, particolarmente nelle prime 48 ore <sup>(2)</sup> (Livello di evidenza 3)

- Vi è una elevata probabilità di successo del test del sudore in bambini <6 settimane di età se non di razza afro-americana o di peso inferiore a 2 Kg <sup>(3, 4)</sup> anche se è stato segnalato che la raccolta sudore può essere insufficiente nei bambini <2.5Kg <sup>(156)</sup> (Livello di evidenza 2+)
- Il consenso sulla pratica clinica corrente evidenzia che può essere difficile raccogliere adeguate quantità di sudore dai neonati molto piccoli, specialmente sotto i 3Kg di peso (Livello di evidenza 4)
- Gli elettroliti nel sudore possono essere elevati nei neonati e bambini disidratati e ridotti nei bambini in trattamento corticosteroideo sistemico o con edema <sup>(5,6)</sup> (Livello di evidenza 4)
- E' stato evidenziato che il farmaco Topiramato diminuisce la produzione del sudore e dare quindi valori falsi positivi <sup>(158, 159, 165)</sup> (Livello di evidenza 3)
- Gli elettroliti nel sudore possono essere elevati nei neonati sottopeso (rapporto altezza / peso<75%) e nei bambini malnutriti (<3 ° percentile di peso e <10 ° percentile altezza) <sup>(143,144,145)</sup> e nei bambini con crescita stentata per motivi psico-sociali <sup>(145,146)</sup> (Livello di evidenza 3)
- Gli elettroliti nel sudore possono essere elevati se il sito di stimolazione e raccolta del sudore è affetto da eczema<sup>(7)</sup> (Livello di evidenza 3)
- Gli elettroliti nel sudore non sono influenzati da diuretici o da fluidi endovenosi, se il paziente resta stabile <sup>(5)</sup> (Livello di evidenza 4)

#### Raccomandazioni

- Il test del sudore può essere eseguito in neonati dopo due settimane di vita con peso superiore a 2kg che siano normalmente idratati e che non abbiano malattie sistemiche [Grado 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 [Grado C]
- Il test del sudore dovrebbe essere rimandato nei bambini edematosi o in trattamento con Topiramato o in trattamento corticosteroideo [Grado D]
- Il test del sudore deve essere rimandato nei bambini disidratati, sottopeso, con patologie sistemiche, o affetti da eczema nel sito di stimolazione [Grado D]

Vedere anche sezione 6.6

Gli elettroliti nel sudore non sono influenzati dalla flucloxacillina. Non ci sono dati per altri antibiotici <sup>(8)</sup> (Livello di evidenza 2+)

#### **Raccomandazioni**

- Il test del sudore può essere eseguito in soggetti in trattamento con flucloxacillina [Grado C]

Secondo le linee guida CLSI <sup>(9,26)</sup> il test del sudore non dovrebbe essere eseguito in soggetti in O2 terapia con dispositivo aperto per eventuali rischi remoti di esplosioni in seguito a scintille.

Sono esclusi i pazienti con maschera facciale o con cannule nasali

Non può essere trascurato il rischio di esplosione dovuta ad una scintilla elettrica, sebbene sia un'eventualità remota. Non ci sono evidenze a supporto di questa raccomandazione (Livello di evidenza 4)

#### **Raccomandazioni**

- Il test del sudore non dovrebbe essere eseguito in soggetti in O2 terapia con dispositivo aperto (inclusa cappa solo testa). Questo non è applicabile ai bambini con maschera facciale o con cannule nasali [Grado D]

## **2.2 Il test del sudore nei protocolli di screening neonatale**

Il test del sudore è un'indagine fondamentale per la conferma della diagnosi di CF nonostante il test di screening neonatale positivo, come dimostra Massie, Clements et al nella revisione di il programma di screening neonatale condotto in Australia CF <sup>(13)</sup>. In questo programma i neonati sono classificati come aventi un risultato di screening positivo se IRT è > 99 ° percentile e sono state identificate 1 o 2 mutazioni CFTR. L'analisi test del sudore viene utilizzata per diagnosticare i neonati eterozigoti per 1 mutazione nel gene CFTR in affetti o portatori sani (Livello di evidenza 2 ++)

Il test del sudore deve essere eseguito solo in laboratori di comprovata esperienza nell'eseguire il test del sudore nei bambini sotto i 3 mesi di età (Livello di evidenza 4)

Tutti i neonati identificati in un programma di screening neonatale dovrebbero avere il risultato del test del sudore disponibile alla prima visita, in particolare quelli con solo 1 mutazione identificata <sup>(14)</sup> (Livello di evidenza 4)

#### **Raccomandazioni**

- Il test del sudore è un esame fondamentale per la conferma di Fibrosi Cistica nonostante uno positivo test di screening neonatale [Grado C]
- Il test del sudore eseguito in seguito alla positività dello screening neonatale dovrebbe essere eseguito solo in laboratori con esperienza nei test in pazienti con meno di 3 mesi [Grado D]
- I risultati del test del sudore dovrebbero essere disponibili alla prima visita per i neonati identificati dal programma di screening neonatale [Grado D]

### **3. Raccolta del sudore**

Le sezioni che seguono forniscono raccomandazioni per l'esecuzione e la relativa evidenza su cui si basano

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

Il sottogruppo inglese di Laboratorio ha confermato che la maggior parte dei centri che effettuano il test del sudore utilizzano la superficie flessoria dell'avambraccio quale sito di raccolta<sup>(15)</sup>. Il catodo può essere posizionato in vari punti della superficie flessoria o estensoria dello stesso avambraccio o sulla parte alta del braccio. Schiena, torace e coscia sono impiegati con successo da alcuni centri <sup>(16)</sup>. (Livello di evidenza 4)

#### **Raccomandazioni**

- 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 [Grado D]

##### **3.1.1 Evitare la contaminazione**

Le linee guida NCCLS <sup>(9)</sup> forniscono le seguenti istruzioni dettagliate:

Non stimolare il sudore in siti che sono vistosamente infiammati o sanguinanti. Usare garza o carta da filtro a basso contenuto di sodio e cloro. Lavare ed asciugare la cute del paziente a fondo. Non maneggiare direttamente con le dita il contenitore da pesare, il parafilm, il sito di raccolta o la carta da filtro per la raccolta. Usare sempre pinzette o guanti senza talco (Livello di evidenza 4)

L'uso di gel anestetico locale (ad esempio ametocaina gel al 4% (Ametop)) è stato segnalato come causa di contaminazione nel sudore<sup>(17)</sup>. Deve essere evitato l'uso di qualsiasi soluzione che contiene ioni cloruro (ad esempio clorexidina) (Livello di evidenza 4)

Grande attenzione va posta in tutte le fasi della procedura per impedire la contaminazione. Non è raccomandato l'uso di gel anestetici locali

#### **Raccomandazioni**

- Grande attenzione va posta in tutte le fasi della procedura per impedire la contaminazione (vd. SOP di esempio). Non usare soluzioni contenenti cloruri per pulire la cute, non applicare il gel anestetico locale [Grado D]

### **3.1.2 Numero di campioni**

Pochi centri in Inghilterra effettuano sempre o talvolta 2 raccolte separate in risposta ad una richiesta di test del sudore<sup>(16)</sup> questo è raccomandato anche nelle linee guida dell'NCCLS<sup>(18)</sup>. Le linee guida CLSI<sup>(9)</sup> suggeriscono che l'esecuzione bilaterale del test è utile. La ragione fornita è il controllo di qualità - una discrepanza tra i due risultati evidenzia una precisione inaccettabile nella performance dei test in duplicato. Un audit su 158 test in doppio (braccio dx, braccio sn) su pazienti FC in cura presso un centro inglese, ha rivelato che nessun paziente FC sarebbe sfuggito se il test fosse stato eseguito su un solo braccio. Un'analisi statistica (Altman Bland difference plot)<sup>(155)</sup> dei dati ha mostrato che non c'è inaccuratezza tra le due braccia e un intervallo di confidenza al 95% per il cloro pari a 20 mmol/L<sup>(15, 16)</sup>. Altri due studi hanno anche esaminato la necessità dell'esecuzione di due raccolte separate<sup>(19, 149)</sup> (Livello di evidenza 2+) ed hanno identificato che il test in duplicato riduce il tasso di fallimento con un impatto scarso sul costo ma una riduzione nel numero di visite necessaria. L'analisi in duplicato non identifica errori sistematici o contaminazioni dei reagenti o dei materiali usati in quella seduta (Livello di evidenza 4)

#### **Raccomandazioni**

- Effettuare il test del sudore in duplicato comporta una dilatazione dei tempi di raccolta ed il discomfort per il paziente ma diminuisce tasso di fallimento [Grado C]
- In risposta ad una richiesta di test del sudore, è sufficiente un solo test a meno che i risultati suggeriscano anomalie di raccolta o test sospetto [Grado D]

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

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

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

E' raccomandato che gli elettrodi non devono mai attraversare il tronco; usare sempre di preferenza il braccio dx, invece del sinistro <sup>(21)</sup>.

Dovrebbe essere presente uscita di sicurezza, per prevenire un aumento di corrente dovuto alla diminuzione della resistenza della cute per prevenire ad esempio la formazione di bolle <sup>(21, 22)</sup>. Sono stati pubblicati i diagrammi dei circuiti elettrici alcuni dei quali incorporano un circuito di sicurezza<sup>(21)</sup> Attrezzature costruite artigianalmente dalla fisica medica o da un elettricista senza una verifica indipendente non possono più essere considerate rispondenti agli standard di sicurezza. I sistemi Wescor incorporano sia un salvavita per la corrente, che per le alte resistenze <sup>(24,25)</sup>, come pure i generatori della C&S Electronics <sup>(26)</sup>. (Livello di evidenza 4)

Gli standard CPA<sup>(27)</sup> affermano: le superfici di lavoro e tutta la strumentazione devono essere sicure, pulite e mantenute. Si deve verificare se tutta la strumentazione è conforme ai "Requisiti di sicurezza per la strumentazione elettrica di misura, controllo e per uso laboratoristico" (C5). Ci devono essere procedure operative standard per la regolare manutenzione delle apparecchiature (Standard D 1.2). Il Dipartimento deve avere una procedura per riferire eventuali incidenti ai dispositivi medici alle autorità predisposte. (Livello di evidenza 4)

Inoltre, l'operatore, ad ogni utilizzo, deve effettuare un controllo visivo della alimentazione per identificare eventuali danni o malfunzionamenti. La sicurezza elettrica di tutti gli alimentatori deve essere regolarmente testata da un elettricista e conservata in appositi registri. La frequenza dei test effettuati deve essere conforme con la valutazione del rischio locale in base alla locale politica di manutenzione <sup>(147)</sup>.



Gli elettrodi sono stati costruiti con diversi materiali. Schwarz ha dimostrato la penetrazione di ioni metallici nei tamponi durante la iontoforesi <sup>(22)</sup>. Questo riguarda soprattutto piombo e rame, ma può essere minimizzato aumentando lo spessore del tampone con gli elettroliti. (Livello di evidenza 3)

Gli elettrodi devono essere puliti ad ogni procedura di iontoforesi. Wescor consiglia l'uso di acqua deionizzata per elettrodi Macroduct<sup>®</sup>, e se necessario per lucidare gli elettrodi in acciaio l'uso di un tampone ; lana, carta vetrata o panno smerigliato non devono essere utilizzati <sup>(25)</sup>.

#### **Raccomandazioni**

- Il generatore deve essere alimentato a batteria e dovrebbe avere un salvavita che limiti la quantità di corrente a 5mA. Durante la iontoforesi si dovrebbe monitorare la corrente, dove possibile. I sistemi Wescor<sup>®</sup>, non hanno un amperometro ma un appropriato dispositivo salvavita.
- L'operatore, ad ogni utilizzo, deve effettuare un controllo visivo della alimentazione per identificare eventuali danni o malfunzionamenti. Deve essere regolarmente testata da un elettricista la sicurezza elettrica di tutti gli alimentatori conservata in appositi registri [Grado D]
- Gli elettrodi dovrebbero essere di dimensione e curvatura tali da adattarsi comodamente all'arto del paziente:
  - gli elettrodi dovrebbero essere fermamente fissati in posizione ma non eccessivamente da impedire la circolazione del sangue
  - gli elettrodi devono essere regolarmente puliti e ispezionati e buttati se mostrano buchi o irregolarità [Grado D]
- La scelta di un nuovo equipaggiamento e il mantenimento dell'equipaggiamento esistente, deve essere conforme allo standard CPA (o standard equivalente) [Grado D]

#### **3.2.2 Soluzioni di elettroliti:**

Price <sup>(28)</sup> ha mostrato che concentrazioni crescenti di nitrato di pilocarpina da 0,5 a 5,0 g/L aumentavano la resa del sudore, tra 0 and 0.5 g/L abbassavano la resa e con valori >1g/L si stabilizza . Viceversa, la concentrazione di cloro mostra dei valori di plateau accettabili utilizzando concentrazioni

di pilocarpine a 0,5 g / L, diminuendo la concentrazione di pilocarpina la resa di cloro è nettamente più superiore. ....(Livello di evidenza 3)

Il nitrato di pilocarpina è universalmente usato quale fonte di pilocarpina all'anodo, sostituendo l'idrocloruro di pilocarpina <sup>(29)</sup> nella precedente letteratura. Le concentrazioni usate variano da 0,64 g/L <sup>(29)</sup> a 15 g/L <sup>(30)</sup>, con un singolo caso in cui è stata usata una concentrazione di 100g/L <sup>(31)</sup>. (Livello di evidenza 4)

La soluzione di elettroliti al catodo è arbitraria e serve a completare il circuito elettrico <sup>(22, 29, 32, 33, 34)</sup>. I sistemi Wescor con Pilogel usano nitrato di pilocarpina sia al catodo che all'anodo <sup>(30,35)</sup>. Evitare di usare soluzioni di elettroliti contenenti sodio e cloro per ridurre la possibilità di contaminare l'anodo sembrerebbe ragionevole, ma il fenomeno non è stato sufficientemente studiato.....(Livello di evidenza 4)

L'impiego di soluzioni alcaline come il bicarbonato di sodio si è dimostrato diminuire la probabilità di bruciature da acido <sup>(22, 28)</sup> (Livello di evidenza 3)

Da uno studio osservazionale in Inghilterra <sup>(36)</sup> è emerso che i centri che hanno risposto usavano 2-5 g/L di nitrato di pilocarpina su garza, o carta da filtro o 5 g/L di nitrato di pilocarpina su dischi di gel. Al catodo tutti i centri virtualmente usavano solfato di magnesio a varie concentrazioni (da 0,05 a 2,0 mol/L) o nitrato di pilocarpina come per l'anodo. (Livello di evidenza 4)

#### **Raccomandazioni**

- 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 [Grado D]
- Le soluzioni contenenti cloro dovrebbero essere evitate perché contaminerebbero la raccolta [Grado D]
- Soluzioni acide non tamponate non dovrebbero essere usate a causa dell'aumentato rischio di bruciature [Grado C]

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

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

In Inghilterra, la pilocarpina o altri elettroliti usati con tali sistemi rientrano nella categoria dei prodotti medicinali senza licenza (descritti comunemente come "speciali")<sup>(37)</sup>. Essi possono essere forniti solo in condizioni molto limitate, da quelle ditte che possiedono la licenza "specials"<sup>(38)</sup>. Essi includono un numero di dipartimenti di farmacia ospedaliera classificati come farmacie di produzione così come le compagnie commerciali. Una lista aggiornata dei contatti viene pubblicata regolarmente in BNF<sup>(39)</sup>.

I laboratori di biochimica clinica non hanno i requisiti legali di costruttori con licenza "specials", e non dovrebbero farsi in casa le soluzioni per iontoforesi. (Livello di evidenza 4)

## Raccomandazioni

- Gli elettroliti usati per la iontoforesi devono essere parte di un dispositivo medico (Es: dischi di pilogel della Wescor) o forniti da un produttore riconosciuto di prodotti medici "senza licenza". Le soluzioni non devono essere prodotte da laboratori ospedalieri [Grado D]

### 3.2.3 Iontoforesi: tempi e tensione elettrica

Il primo riferimento sulla iontoforesi<sup>(32)</sup> specificava 2 mA/4,9cm<sup>2</sup> (dopo un lento aumento) per 5 min se si usano supporti di carta da filtro, 15 min se si usano garze. Altri vecchi lavori citavano correnti di 2-5 mA fino a 15 min, senza studiare l'effetto della variazione<sup>(21, 22, 40, 29, 33, 41)</sup>. Il primo sistema di raccolta del sudore della Webster – modello 3500<sup>(24,34)</sup> usava tamponi di garza e suggeriva una corrente di 1,5 mA per 5 min, dopo un lento aumento, fornite da generatori settabili da 1 a 5 mA. ....(Livello di evidenza 3)

Webster<sup>(42)</sup> rivide le basi teoriche del calcolo della distribuzione di pilocarpina per cm<sup>2</sup> di superficie cutanea e concluse che il sistema cute + ghiandole + capillari era troppo complesso per questo per essere valido. Egli concluse che le condizioni della cute potevano essere solo stabilite empiricamente. Egli dimostrò che aumentando la durata della iontoforesi da 1 a 3 min con una corrente di 1,5 mA, aumentava la velocità di produzione del sudore, comunque un ulteriore aumento della durata della iontoforesi da 3 a 7 min non produceva un aumento della velocità di produzione del sudore. Kirk<sup>(43)</sup> dimostrò che una corrente di 1, 2 o 4 mA non alterava i risultati del sodio o dell'osmolalità. (Livello di evidenza 3)

Un'indagine condotta negli anni 1998-99 di 30 laboratori del Regno Unito<sup>(36)</sup> ha identificato l'uso di correnti di 1,5 e 4 mA applicate per 4-10 minuti. Solo 2 centri usano > 5.5 mA

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

I manuali di istruzione della WescorMacroduct® affermano: con l'introduzione dei dischi di Pilogel di pilocarpina <sup>(35)</sup> lo stimolatore modello 3700 della Wescor è stato settato per generare una corrente di 1,5 mA per 5 min <sup>(25)</sup>. L'operatore non può intervenire. (Livello di evidenza 4)

### **WescorNanoduct®**

Il sistema Nanoduct della Wescor <sup>(30, 44, 45, 46, 47)</sup> impiega una corrente di 0,3mA per 2.5 min non quando si utilizzano gli elettrodi più piccoli e aumenta la concentrazione di pilocarpina di 3 volte nel gel con tampone citrato <sup>(138)</sup>. Il sistema è progettato per misurare la conduttività del sudore *in situ* dopo iontoforesi pilocarpinica utilizzando un sensore di conducibilità. (Livello di evidenza 4)

## Raccomandazioni

- quando la soluzione elettrolitica acquosa viene applicata sull'elettrodo si dovrebbe applicare una corrente minima di 1,5 mA aumentandola progressivamente fino a un massimo di 4 mA. Una volta raggiunto il massimo voltaggio questo dovrebbe essere mantenuto da un minimo di 3 minuti a un massimo di 5 minuti [Grado D]
- Quando si utilizzano sistemi Wescor®, bisognerebbe seguire le indicazioni del produttore riguardo la durata dell'applicazione e il voltaggio da usare. Questo dipende dalle specifiche del modello utilizzato in quanto tutti i modelli gestiscono automaticamente voltaggio e tempo di applicazione [Grado D]
- i sistemi Wescor® e C&IS Electronic Gibson-Cooke Power supply devono essere tenuti sotto stretta osservazione durante l'esecuzione della ionoforesi [Grado D]
- Il sistema Wescor® Nanoduct non è raccomandato per la stimolazione e l'analisi del test del sudore [Grado D]

### 3.2.4 Quali problemi di sicurezza devono essere considerati durante la Ionoforesi?

1. il documento di Schwarz<sup>(22)</sup> ha esaminato i rischi in dettaglio. Il documento descrive una serie di esperimenti che hanno valutato i fattori predisponenti alle vesciche e alle ustioni. Schwarz ha dimostrato che la somministrazione di atropina produce una zona di edema e gonfiore e riduce la resistenza della cute di un fattore variabile tra 40 e 100. La somministrazione di atropina attraverso la ionoforesi a 4mA per 5 minuti produceva dolore, abrasioni e papule. Egli ha osservato che con ionoforesi a corrente costante, la resistenza della cute si riduceva marcatamente formandosi vesciche. Le seguenti misure aumentano il rischio di complicanze:
  - ◆ Stringere eccessivamente gli elettrodi produce vesciche peggiori di quelle prodotte da elettrodi adeguatamente applicati
  - ◆ Il pH più basso e le vesciche peggiori sono state evidenziate con l'utilizzo di acido cloridrico tamponato a concentrazioni fino a 0,01 mmol / L. Utilizzando 4,5 g / l di nitrato di pilocarpina e 12 carte da filtro il pH di quelle a contatto con la cute era di 5,9, mentre quelle più vicine all'elettrodo mostravano un PH di 4,2 dopo l'applicazione di una corrente pari a 4 mA somministrata per 5 min.
  - ◆ l'utilizzo di poche carte da filtro ha prodotto più vesciche

- ◆ l'utilizzo di carte da filtro non adeguatamente imbevute o asciutte ha prodotto più vesciche  
(Livello di evidenza 2+)

Lo studio originale sulla ionoforesi<sup>(32)</sup> raramente attribuisce al contatto cute elettrodo la presenza di ustioni. Uno studio su larga scala (7200 test)<sup>(29)</sup> ha riportato ustioni superficiali riferibili al contatto catodo-cute con una percentuale < 1: 200 (Livello di evidenza 3)

2. I report di effetti avversi sono tutti riportati in studi con numeri troppo piccoli

- a. uno studio aneddótico<sup>(48)</sup> ha riportato un ustione, durante un test del sudore, provocata da un operatore inesperto che non aveva monitorato il paziente durante l'esecuzione della ionoforesi (Livello di evidenza 3)
- b. Rattenbury<sup>(49)</sup> ha riportato due casi di ustioni durante il test provocate da tecnici esperti. In un caso, gli elettrodi erano stati applicati senza gel di pilocarpina. Nel secondo, il bambino presentava un eczema, anche se non sulla superficie di esecuzione del test. Un questionario ha indicato che 6 ambulatori pediatrici su 10 talvolta avevano riscontrato della ustioni dopo l'esecuzione del test. Frequentemente è stato osservato un arrossamento della cute (Livello di evidenza 3)
- c. due incidenti<sup>(50)</sup> segnalati al MDA sono stati attribuiti all'uso della fibbia e elettrodi corrosi o con scarsa manutenzione e ciò ha portato alla pubblicazione di un avviso di sicurezza. Tutto ciò suggerisce che i tamponi siano leggermente più grandi degli elettrodi per ridurre al minimo la possibilità di contatto elettrodo-cute. Nessun incidente è stato segnalato alla Scottish Incident Reporting (Livello di evidenza 3)

3. Le indagini nazionali<sup>(36)</sup> hanno rilevato che 21 centri su 30 avevano osservato arrossamenti o orticaria e 7 avevano, invece, rilevato vesciche o ustioni. Le indagini regionali, che utilizzano gli stessi o questionari simili hanno mostrato alcune discrepanze in quanto non sono state segnalate ustioni<sup>(52, 53)</sup>. (Livello di evidenza 3)

4. Vi è un rischio teorico di fibrillazione atriale, ma questo non è mai stato documentato (Livello di evidenza 4)

Ustioni o vesciche sono sporadicamente riferite quali risultanti dal contatto elettrodo-cute o da un inadeguata quantità di soluzione elettrolitica tra la pelle e l'elettrodo. Il rischio può essere minimizzato

utilizzando tamponi ben imbevuti di dimensioni e spessore adeguato, e ponendo l'attenzione sul paziente qualora dia segni di disagio o di disturbo a causa degli elettrodi durante la ionoforesi.

A causa della arrossamento della pelle che si verifica durante la procedura di raccolta sudore e ai rari casi di ustioni sui pazienti, questi devono essere avvisati prima di dare il consenso per l'esecuzione del test del sudore per quanto riguarda i piccoli rischi a cui vanno incontro. Tali informazioni possono essere incluse in un foglio di informativo (vedi Appendice 1 - il test del sudore: cos'è, e come viene eseguito)

#### **Raccomandazioni**

- Devono essere utilizzati tamponi di spessore adeguato per le soluzioni elettrolitiche al fine di ridurre al minimo le ustioni da acido [Grado C]
- I sistemi ibridi, come ad esempio il sistema Wescor® power utilizzato con soluzioni elettrolitiche acquose, o i dischi Wescor® utilizzato con sistemi diversi dal proprio, non dovrebbero essere utilizzati in quanto questo può provocare lesioni [Grado D]

### **3.3 Quale mezzo di raccolta deve essere utilizzato e dopo quanto tempo il sudore può essere raccolto?**

Il sudore deve essere raccolto in quantità sufficiente per un'analisi accurata e precisa. Durante la raccolta deve essere protetto dalla contaminazione e dall'evaporazione (vedi esempio in appendici 2a e 2b) (Livello di evidenza 4)

#### **3.3.1 Quale mezzo di raccolta deve essere utilizzato?**

1. Gibson e Cooke<sup>(32)</sup> hanno descritto la raccolta del sudore su un filtro circolare di carta di 2,5 cm di diametro o su garza quadrata della dimensione di 7,5x7,5cm. La possibile contaminazione di cloruro di sodio ha portato alcuni autori a lavare e asciugare la carta da filtro o la garza prima dell'uso<sup>(41)</sup> (Livello di evidenza 2-)
2. Le carte da filtro devono essere coperte da materiale impermeabile, e fissate in posizione con del nastro adesivo. I materiali adatti per tale procedura includono polietilene, parafilm e seta oliata (Livello di evidenza 4)

#### **Raccomandazioni**



- Il sudore deve essere raccolto su carta da filtro pre-pesata non contaminata da cloruro di sodio o su garza di dimensione approssimativamente uguale a quella della zona stimolata o con Wescor Macroduct® [Grado D]
- Il filtro di carta o la garza devono essere sigillati sopra l'area stimolata con materiale impermeabile quale il polietilene o il parafilm fissato con nastro adesivo a sua volta impermeabile. Si deve prestare attenzione che tenuta dell'area stimolata resti intatta durante la raccolta [Grado D]
- Durante raccolta qualunque sia il metodo, il sudore deve essere protetto dalla contaminazione, così come dalla condensazione e dall'evaporazione (vedi esempio appendici 2a e 2b) [Grado D]

### 3.3.2 Dopo quanto tempo il sudore può essere raccolto?

C'è una grande quantità di dati sperimentali circa l'effetto del tempo sulla raccolta e sulla concentrazione del sudore.

1. Diverse modalità di raccolta del sudore sono state effettuate per un periodo di 5 minuti su differenti carte da filtro,<sup>(29)</sup> con il sistema Macroduct®,<sup>(54)</sup> o altri sistemi a tubi<sup>(55)</sup> sezionandoli o misurando la conduttività continuamente<sup>(30)</sup>. Tutti gli autori hanno concluso che la secrezione di sudore stimolata è inizialmente bassa, successivamente aumenta, ma una volta raggiunto il picco (approssimativamente dopo 2 minuti), tende a diminuire con il tempo (Livello di evidenza 2+)
2. Le misure di osmolarità e conduttività hanno dimostrato la concentrazione diminuisce in tandem alla percentuale di secrezione<sup>(28,30,34,54,55,56)</sup> (Livello di evidenza 2+)
3. La diminuzione del tempo di raccolta del sudore da 60 a 30 minuti ha portato ad una diminuzione, statisticamente insignificante, del peso del sudore raccolto da 520 mg a 490 mg<sup>(16)</sup>. Estendendo il tempo di raccolta oltre i 30 minuti si produce un piccolo peso/volume addizionale. (Livello di evidenza 3)
4. Misurazioni in situ (elettrodo Orion) non dovrebbe essere usato<sup>(57)</sup> (Livello di evidenza 2+)

Raccomandazioni
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Il sudore dovrebbe essere raccolto non prima dei 20 minuti (a meno che il tubo del Macroduct® non si riempia prima) e non oltre i 30 minuti [Grado C]</li></ul>



### 3.3.3 Come dovrebbe essere rimosso un campione Macroduct®?

Una causa comune di mancata raccolta con il sistema Macroduct® è un tecnica scorretta di rimozione del campione dal braccio del paziente. Il produttore del sistema fornisce istruzioni circa la modalità di raccolta. La porzione terminale libera del tubo deve essere bloccata con una siringa o un sistema per clampaggio e successivamente tagliato il fissaggio al Macroduct. Tentare di rimuovere il Macroduct dal braccio del paziente mentre il tubo è ancora avvolto sul raccoglitore porta solitamente alla perdita del campione. (Livello di evidenza 4)

Raccomandazioni
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ La raccolta del sudore con il sistema Macroduct® dovrebbe avvenire bloccando la porzione terminale del tubo con una siringa o clampandolo e tagliando il fissaggio al Macroduct [Grado D]</li></ul>



## 4. Come dovrebbe essere analizzato il sudore?

### 4.1 Quali aspetti pre analitici dovrebbero essere considerati?

#### 4.1.1 Come dovrebbe essere conservato il campione di sudore prima dell'analisi?

L'evaporazione del sudore durante la raccolta, il trasferimento e il trasporto è una causa potenziale di errore nel test del sudore<sup>(9)</sup>

- i campioni di sudore raccolti su carta da filtro, ripesati e chiusi nell'ampolla ermeticamente, sono stabili per un periodo di 72 a 4°C con o senza diluente<sup>(59)</sup> (Livello di evidenza 2+)
- Tempo e condizioni di conservazione dovrebbero essere approvate da ogni laboratorio<sup>(60)</sup> (Livello di evidenza 4)
- Il sudore liquido, se conservato in tubi Macroduct® adeguatamente sigillati, risulta essere stabile per più di 72 ore a una temperatura di 4°C, ma non a temperatura ambiente dove l'evaporazione avviene dopo 48 ore (Livello di evidenza 3)
- Il sudore liquido è stabile nelle provette PCR 200ul con tappi a cupola per un massimo di 72 ore in frigorifero (3-7°C) o se riscaldati (35-39°C)<sup>(148)</sup> (Livello di evidenza 2-)

- Il sudore liquido può anche essere conservato, fino a 6 ore, in tubi capillari da 100TL i quali devono essere sigillati con plastilina, un piccolo strato di aria viene lasciato tra il sudore e plastilina.<sup>(62)</sup> (Livello di evidenza 4)

<b>Raccomandazioni</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Durante la raccolta, il trasporto e l'analisi del sudore, ogni sforzo deve essere fatto per minimizzare l'evaporazione del campione [Grado D]</li> <li>▪ Se prima dell'analisi è necessaria la conservazione del campione, raccolto su carta da filtro, questo dovrebbe essere mantenuto a 4°C per un massimo di 3 giorni, e in contenitori appropriati a tenuta stagna che non permettano l'evaporazione [Grado C]</li> <li>▪ Il sudore liquido proveniente dal sistema Macroduct® può essere conservato sia nei tubi Macroduct opportunamente sigillati o in provette per PCR fino a 72 ore a 4°C. I sistemi per ematocrito sigillati con plastilina, sono altresì adatti a condizione che venga lasciata una certa quantità di aria tra il sudore e il sigillo [Grado D]</li> <li>▪ La conservazione di sudore liquido fino a 72 ore a temperature più elevate dovrebbe avvenire in provette per PCR [Grado C]</li> <li>▪ Il sudore può essere raccolto in sedi periferiche e trasportato in laboratorio per l'analisi facendo attenzione ai dettagli di conservazione [Grado D]</li> </ul>

#### **4.1.2. Come deve essere determinato il peso/volume del sudore?**

Al fine di valutare con precisione la quantità di sudore al milligrammo, è necessaria una bilancia sensibile allo 0.0001g, come raccomandato dal CLSI (9). La stessa bilancia deve essere utilizzata per pesare il contenitore della carta da filtro prima e dopo l'esecuzione del test. La pesatura dopo la raccolta dovrebbe avvenire non appena possibile. Usare sempre guanti senza polvere. (Livello di evidenza 4)

<b>Raccomandazioni</b>
------------------------

- Deve essere usata sempre la stessa bilancia durante l'esecuzione del test [Grado D]
- Per pesare il sudore bisogna sempre usare una bilancia con una sensibilità pari a 0,001g [Grado D]
- Il sudore raccolto su carta da filtro dovrebbe essere pesato ed analizzato il prima possibile [Grado D]

#### 4.1.3 Cos'è un campione adeguato?

È considerata adeguata una quantità di sudore secreto pari a  $1\text{g}/\text{m}^2/\text{min}^{(9)}$  dove con l'unità di misura  $\text{m}^2$  si indica la superficie di raccolta. Quantità inferiori a  $1\text{g}/\text{m}^2/\text{min}$  indicano una sudorazione non ottimale o che si è verificata una perdita significativa di sudore attraverso l'evaporazione<sup>(15)</sup>. Goldberg et al. hanno identificato conduttività discordanti comparando campioni di sudore, dove un gruppo era composto campioni con valori < di 15ul mentre nel secondo gruppo i valori erano >15ul (un volume corrispondente alla quantità minima di sudore). La conduttività maggiore si riscontrava nei campioni <15ul. Lo studio ha altresì mostrato che sebbene il 97% dei campioni analizzati erano comparabili (entro 1.96 DS), la concentrazione di cloruro era significativamente maggiore nei campioni di volume ridotto ( $28.4\pm 15.7$  vs  $25.1\pm 15.2$ mmol/L). All'appendice 3 si trova il calcolo della percentuale media di sudore raccolto nell'unità di tempo (Livello di evidenza 2-)

#### Raccomandazioni

- Il tasso di secrezione di sudore, misurato come tasso medio del tempo di raccolta, non dovrebbe essere inferiore a  $1\text{g}/\text{m}^2/\text{min}$ . Quantità inferiori a non dovrebbero essere analizzate. Quando la quantità raccolta è insufficiente il test del sudore andrebbe ripetuto [Grado D]

#### 4.2 Come deve essere preparato per l'analisi il campione?

##### 4.2.1 Come deve essere eluito il sudore raccolto su carta da filtro?

Comunemente il tempo utilizzato per l'eluizione del sudore è di 30 min<sup>(52)</sup>, tuttavia recenti studi<sup>(63)</sup> hanno mostrato che eluendo il sudore, fino a 180 minuti, non si ha alcun effetto sulla concentrazione di cloruro (Livello di evidenza 2+). Prima di essere analizzato il campione deve essere accuratamente omogeneizzato e mescolato (Livello di evidenza 4)

##### 4.2.2 Come deve essere preparato il sudore quando viene raccolto con il sistema Macroduct®?

Il sudore raccolto utilizzando il sistema Wescor Macroduct® deve essere svuotato con molta attenzione e mescolato prima di essere analizzato per assicurare un'adeguata misurazione. (Livello di evidenza 4)

## Raccomandazioni

- Quando il sudore è raccolto sulle carte da filtro (sezione 3.2.1) il tempo di eluizione dovrebbe essere maggiore di 1 minuto e minore di 180 min [Grado C]
- I campioni devono essere omogeneizzati e mescolati prima di essere analizzati [Grado D]
- Il sudore raccolto utilizzando il sistema Wescor Macroduct® deve essere svuotato con molta attenzione e mescolato prima di essere analizzato [Grado D]

### 4.3 Quali analiti devono essere misurati nel sudore per la diagnosi di FC?

#### 4.3.1 Quale concentrazione di cloruro deve essere misurata?

Il cloruro nel sudore è l'analita dosato in quanto è direttamente legato alla anomala funzione del regolatore di transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), in quanto il canale del cloro è difettoso nei pazienti affetti da fibrosi cistica <sup>(64, 65, 66)</sup>, pertanto è consigliato come l'analita di prima scelta. <sup>(9, 60)</sup> (Livello di evidenza 2 ++)

#### 4.3.2 Possono essere misurati sodio, potassio e osmolarità?

Poiché questi analiti non permettono di discriminare, come il cloruro, tra soggetti sani e soggetti affetti da CF <sup>(67, 68, 69, 70, 71, 72, 115)</sup>, il loro uso non è più raccomandato (Livello di evidenza 2-).

#### 4.3.3 Potrebbe essere misurata la conduttività?

In FC gli altri elementi costituenti il sudore, quali sodio e potassio risultano aumentati, così come la concentrazione totale degli ioni (conduttività e osmolarità). Dato che la misura della conduttività riflette la concentrazione degli ioni cloro più che altri quali il sodio e che, tali analiti, hanno scarsa relazione con la funzione del CFTR, ci si potrebbe aspettare che la misura della conduttività non sia capace di discriminare tra popolazione affetta e non.

I dati provenienti dal UK NEQAS Sweat Testing Survey<sup>(73)</sup> fornisce i dati di un accordo comparativo tra laboratori per la misurazione della conduttività rapportata alla misura del cloro (sezione 5.4) (Livello di evidenza 3)

La US Cystic Fibrosis Foundation rammenta che non è opportuno effettuare il test del sudore usando conduttività<sup>(74)</sup>. Le linee guida CLSI<sup>(9)</sup> invitano ad utilizzare la misura della conducibilità come un 'test di screening' come, d'altra parte, fa il Welsh standard<sup>(75)</sup> e questo punto di vista è supportato da una serie di studi <sup>(75,76)</sup>. (Livello di evidenza 2+)

Anche se è stato suggerito che la conducibilità potrebbe essere utilizzata per la diagnosi<sup>(44)</sup>, non vi sono prove che, anche se combinata con l'analisi del genotipo, sia un elemento diagnostico affidabile come il cloruro<sup>(78)</sup>. C'è da dire che la misura della conducibilità, se associata alla concentrazione di cloruro si è rilevata utile nei casi dubbi<sup>(79)</sup> (Livello di evidenza 3)

<b>Raccomandazioni</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Il cloruro è l'analita di prima scelta [Grado B]</li><li>▪ La conduttività dal sudore presa singolarmente non è un test diagnostico adeguato per la diagnosi di FC. La conduttività potrebbe essere utilizzata come test di screening [Grado D]</li><li>▪ Nei bambini sotto i 6 mesi di vita, la concentrazione del cloro dovrebbe essere misurata anche in presenza di livelli normali di conduttività (ciò è dovuto alla scarsità di dati di questa coorte) [Grado D]</li><li>▪ Nei bambini di età superiore ai 6 mesi, la concentrazione del cloro dovrebbe essere misurata se sono presenti livelli di conduttività borderline o positivi [Grado D]</li><li>▪ La misurazione di altri analiti quali sodio/potassio/osmolarità non è raccomandata [Grado D]</li></ul>

#### **4.4 Quale metodo andrebbe usato per il dosaggio?**

(queste linee guida non forniscono raccomandazioni sul metodo da adottare)

##### **4.4.1 Quali metodi sono disponibili per il dosaggio del Cloro?**

I seguenti metodi sono quelli noti ad oggi per il dosaggio del cloro nel sudore.

- a. Coulometria<sup>(80)</sup>
- b. elettrodo indiretto a selezione di ioni<sup>(81,82)</sup>
- c. elettrodo diretto a selezione di ioni (ISE). Un piccolo numero di laboratori riportato nel UK NEQUAS<sup>(73)</sup> utilizzano una grande varietà di metodi che vengono definiti "Direct ISE". Tuttavia non ci sono sufficienti dati per valutare le prestazioni dei suddetti metodi
- d. Colorimetria<sup>(83,81)</sup>
- e. determinazione mercurometrica<sup>(84)</sup>

Altri metodi sono stati descritti in letteratura<sup>(142)</sup> ma non sono più usati nella pratica routinaria. Tutti i metodi devono essere validati prima del loro utilizzo. Quando sono disponibili campioni a sufficienza, è opportuno effettuare una duplice misura analitica del cloro. Un recente studio ha riportato che la comparazione dei metodi analitici ISE e coulometria su uno stesso campione di sudore a dato risultati

simili.<sup>(85)</sup> Qualunque metodo viene usato, esso deve essere in grado di determinare il cloro almeno al limite basso dell'intervallo di riferimento (10mmol/L, CV <20%)<sup>(60)</sup>(Livello di evidenza 4)

Raccomandazioni
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Colorimetria, coulometria, e ISE sono metodi soddisfacenti per l'analisi del cloro nel sudore. Dove è possibile si dovrebbero diversificare le misurazioni analitiche del sudore [Grado D]</li></ul>

#### 4.4.2 Quali metodi sono disponibili per la misurazione della conduttività?

La misurazione della conduttività nel Regno Unito è demandato agli operatori che utilizzano il sistema Wescor Macroduct® che rappresentano <3% di tutti i test effettuati in tutto il Regno Unito secondo il UK NEQAS Sweat Testing Scheme<sup>(73)</sup>. Il sudore raccolto con il sistema Wescor Macroduct® deve essere espulso e mescolato prima di essere analizzato. Per fare ciò si deve ricorrere al sistema Wescor Sweat Cheker™ per garantire coerenza all'analisi (Livello di Evidenza 4)

Il sistema Nanoduct® attualmente non viene raccomandato per fare diagnosi in quanto i dati a supporto dell'uso sono insufficienti<sup>(60,46)</sup>(Livello di evidenza 3) Una volta raccolta una quantità adeguata di sudore, almeno 3µL, il risultato si ha in media dopo un tempo di 5 minuti seguente a un periodo di stabilizzazione.

Barben<sup>(44)</sup> ha misurato la conduttività in 94 soggetti utilizzando il sistema Nanoduct®, comparandolo con il sistema Macroduct®. Con tale sistema ha correttamente identificato 20 pazienti affetti da CF, differenziandoli dai pazienti sani del campione controllo (n=73) inoltre ha riscontrato una minore quantità di campioni insufficienti rispetto al sistema Macroduct®. Tuttavia la differenza media tra la conduttività e la concentrazione di cloro era inferiore a quanto atteso (~7mmol/L invece di ~15mmol/L previsti, in quanto la conduttività è la misurazione di tutti gli ioni non solo di quelli cloro). Questo risultato era stato accennato nella discussione dello studio, tuttavia non è stata data alcuna spiegazione del perché (Livello di evidenza 2-). Un ulteriore studio<sup>(47)</sup> ha esteso il campione a 1041 pazienti in tre differenti località, utilizzando il sistema Nanoduct® come strumento primario si è rilevata una conduttività >50mmol/L confermata attraverso l'analisi del cloro nel sudore (raccolto utilizzando il sistema Macroduct®). Gli autori hanno rilevato un elevata percentuale di errore nei neonati (~50%)(Livello di evidenza 2-)

Uno studio più recente su 487 neonati<sup>(162)</sup> ha comparato il metodo Gibson-Cook con il sistema Nanoduct® all'interno di un programma di screening neonatale. Lo studio ha riportato che il sistema Nanoduct® ha individuato i pazienti affetti da CF allo stesso modo del metodo Gibson-Cook

Losty<sup>(46)</sup> ha ottenuto una percentuale inaccettabilmente alta di falsi negativi utilizzando il Nanoduct® per misurare la conduttività del sudore in un campione di 100 soggetti (36 con manifestazione tipica di CF, 6 con manifestazione non tipica, 58 sani). L'autore ha osservato un importante bias nella conduttività misurata rispetto a quella misurata con il Macroduct®, bias confermato anche dal confronto tra l'analisi del cloro nel sudore e il Nanoduct®. Gli autori hanno criticato la mancanza di un meccanismo esterno per verificare la funzionalità dei sensori Nanoduct®; l'inaspettata alta percentuale di falsi negativi e il bias sono stati il risultato di un guasto ai sensori del Nanoduct® (Livello di Evidenza 2+).

In conclusione, i dati comparativi tra Nanoduct® e Macroduct® disponibili sono pochi; i dati disponibili indicano che i risultati ottenuti con il Nanoduct® sono passibili di Bias importanti sia se comparato con il sistema Macroduct® sia con l'analisi del cloro. Fino a che non saranno disponibili altri dati o che i risultati non siano soddisfacenti, non è possibile raccomandare l'uso del sistema Nanoduct® come strumento per la diagnosi della FC.



Raccomandazioni
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ L'analisi della conduttività utilizzando il sistema Wescor Sweat-Chek™ è un metodo di analisi soddisfacente [Grado D]</li> <li>▪ Il sistema WescorNanoduct® attualmente non è raccomandato per l'esecuzione routinaria del test del sudore[Grado D]</li> </ul>

#### 4.5 Che formato dovrebbe avere il referto?

Il formato del referto è descritto nel dettaglio nel CPA standards<sup>(27)</sup>, ulteriori specifiche si possono ritrovare nelle linee guida Gallesi<sup>(75,27)</sup> (Livello di evidenza 4)

Raccomandazioni
<p>Il referto dovrebbe includere:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>i. le generalità del paziente il richiedente l'esame e l'indirizzo</li> <li>ii. Data e ora del test e data e ora del referto</li> <li>iii. Risultati analitici (mmol/L)</li> <li>iv. Dovrebbe esplicitare quali analiti sono stati analizzati (es. Cl<sup>-</sup>)</li> <li>v. Conduttività (cloruro di sodio equivalente)</li> <li>vi. Il motivo per cui il referto non è disponibile</li> <li>vii. Intervalli di riferimento</li> <li>viii. Interpretazione del risultato [Grado D]</li> </ol>

#### 5. Quali sono i requisiti di qualità per un servizio di test del sudore?

Sono stati pubblicati numerosi rapporti<sup>(86,87,88,89,90)</sup> e comunicazioni personali che riportano l'esperienza clinica di test del sudore non correttamente eseguiti che hanno portato ad un errata diagnosi. I falsi negativi sono di particolare interesse a causa del potenziale ritardo diagnostico<sup>(91)</sup>. La preoccupazione principale riguarda la competenza dell'operatore responsabile dell'esecuzione del test e della raccolta del sudore. Si rende, pertanto, necessario un controllo di qualità e valutazione esterno sì da valutare l'esecuzione del metodo, la competenza dell'analista, la refertazione<sup>(101)</sup> e l'interpretazione.

I risultati falsi negativi o falsi positivi possono derivare da una o più delle seguenti ragioni:

- ◆ Fisiologia del paziente
- ◆ raccolta del sudore inadeguata

- ◆ metodologia scorretta o inaffidabile
- ◆ scarsa tecnica dell'operatore
- ◆ errata interpretazione

Questa sezione riporta le modalità di raccolta del sudore e i metodi di analisi del cloro e della conduttività.

### 5.1 Si può analizzare il sudore se vi è il sospetto di contaminazione o di evaporazione?

Se sul sudore raccolto è stato oggetto di evaporazione o contaminazione, non dovrebbe essere analizzato. Una delle suddette condizioni potrebbe rendere insufficiente la percentuale di sudore analizzabile di 1g/m<sup>2</sup>/min. (sezione 4.1.3). Qualsiasi campione rilevato o fortemente sospetto di evaporazione o contaminazione, non deve essere analizzato (es. sigillatura non ermetica o carta da filtro caduta a terra) (Livello di evidenza 4)

<b>Raccomandazioni</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Il test che ha subito un'evaporazione e/o una contaminazione non deve essere analizzato [Grado D]</li> </ul>

### 5.2 Quali considerazioni bisognerebbe fare quando si sceglie un metodo analitico?

Si dovrebbero usare metodi che consentono la misurazione di analiti in intervalli di concentrazione che coprono soggetti normali e con fibrosi cistica (ad esempio per il cloro 0-150 mmol/L). Dovrebbe essere accertato il limite inferiore di rilevamento del cloro per il metodo in uso che non deve essere superiore a 10 mmol/L.

Le linee guida CPA affermano che ogni test deve essere eseguito e completamente descritto seguendo una procedura operativa standard(SOP)<sup>(27)</sup>. La SOP dovrebbe includere il metodo analitico, le procedure di qualità, la refertazione, l'interpretazione e tutti gli aspetti sulla sicurezza (Livello di evidenza 4)

#### Raccomandazioni

- La gamma dei metodi analitici utilizzati devono essere in grado di rilevare i range di concentrazione che si ritrovano sia in soggetti sani che in soggetti affetti da FC [Grado D]
- I metodi analitici devono essere completamente descritti come procedure operative standard (SOP) per rispettare l'Accreditamento in Patologia Clinica (o standard equivalente)

### 5.3 Quali controlli di qualità interna (IQC) dovrebbero essere usati?

Quando si analizza il sudore raccolto su carta filtro o su garza, i materiali per il controllo di qualità dovrebbero essere trattati nel medesimo modo. Se si utilizza il sudore non diluito (Wescor System®) possono essere analizzate, in controllo di qualità, direttamente le soluzioni del sistema. Le linee guida CPA affermano che le analisi quantitative richiedono livelli multipli di controlli di qualità<sup>(27)</sup>. I materiali per il controllo di qualità dovrebbero avere concentrazioni clinicamente rilevanti e dovrebbero essere differenti dagli standard. Limiti accettabili per ciascun analita dovrebbero essere definiti per ciascun materiale di controllo (Livello di evidenza 4).

Un audit di 73 laboratori effettuato nel 2006<sup>(12)</sup> sul rispetto delle linee guida del 2003 ha dimostrato che solo 5 laboratori non hanno rispettato la raccomandazione ad avere 2 livelli di controllo qualità interno e soli 5 laboratori non hanno raggiunto un CVs<5% (Livello di evidenza 3)

#### Raccomandazioni

- Ci deve essere una procedura interna di controllo qualità (che differisce dalla procedura di calibrazione/standardizzazione) a due raccoglimenti (normale e intermedio o anormale) per ogni analisi [Grado D]

#### 5.3.1 Quale livello di imprecisione potrebbe esserci durante la misurazione del cloro?

Sono stati ottenuti con l'analisi colorimetrica manuale di Gibson-Cook e con il Wescor Macroduct®, alla concentrazione di 70mmol/L di cloro, rispettivamente un CV% di 3.4% e 3.2%<sup>(71)</sup>. CV di 11%, 8% e 4% alla concentrazione di cloro rispettivamente di 30,60 e 120 mmol/L sono state ottenute utilizzando il metodo ISE<sup>(92)</sup>. Heeley et al<sup>(70)</sup> utilizzando un metodo colorimetrico hanno riportato un CV% del 2,5% a una concentrazione di cloro di 50mmol/L. Utilizzando un metodo di titolazione mercuriometrica modificato (Campione di 20µl di volume) per la misurazione del cloruro su campioni raccolti con il

metodo Wescor Macroduct®, hanno riscontrato un CV di 2,1%, 4,7% e del 9,4% rispettivamente a quantità di cloruro pari a /5, 30 e 15 mmol/L<sup>(84)</sup>. (Livello di evidenza 2+)

Raccomandazioni
▪ Il metodo per l'analisi del cloro deve avere un CV tra batch del 5% (o meno) alla concentrazione di 40-50mmol/L [Grado C]

### 5.3.2 Quale livello di imprecisione sarebbe consentito per la conduttività?

Un coefficiente di variazione tra batch di 1.0% è riportato da Hammond<sup>(93)</sup> ad una concentrazione di 67 mmol/L di equivalenti di NaCl. La variazione tra sedute analitiche è stata calcolata pari a 1.32% a 40 mmol/L ed a 1.15% a 123 mmol/L<sup>(102)</sup> (Livello di evidenza 3)

Raccomandazioni
▪ Il metodo per l'analisi della conduttività deve avere un CV tra batch del 2% (o meno) alla concentrazione di 50mmol/L [Grado D]

### 5.4 Quali considerazioni devono essere fatte sulla Valutazione Esterna di Qualità(EQA)?

Il sistema di valutazione di qualità esterno è essenziale al fine di:

- Identificare gli errori di pesatura
- Identificare metodi di analisi poco performanti e problemi quali problemi di standardizzazione/calibrazione
- Identificare gli errori di calcolo
- Identificare problemi di interpretazione

L'EQA non identificherà errori derivanti da un stimolazione inadeguata o da tecniche di raccolta non corrette.

Il UK NEQAS for Sweat Testing, ha dato il via a uno studio pilota nel giugno 1999<sup>(94)</sup> e ha sviluppato un programma mensile accreditato dalla CPA. Più di cinquanta distribuzioni di tre campioni acquosi, necessari per coprire le concentrazioni dei setting clinici, sono state effettuate fino ad oggi. In aggiunta ai risultati numerici di Cloruro, sodio e conduttività, al laboratorio partecipante viene chiesta anche un'interpretazione clinica.

Nel febbraio del 2009 177 laboratori del Regno Unito (su un totale di 215) effettuavano test del sudore<sup>(157)</sup>. I laboratori eseguivano i test come segue:

97	Na <sup>+</sup>
67	conduttività

La suddivisione delle modalità di test erano così suddivise:

76	Na <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup>
33	solo Cl <sup>-</sup>
30	Cl <sup>-</sup> e conduttività
20	Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> e conduttività
17	solo conduttività
1	solo Na <sup>+</sup>

Approssimativamente l'80% dei laboratori utilizzava per raccogliere il sudore il metodo Wescor Macroduct® e con una percentuale in diminuzione il 20% usava carta da filtro.

I dati del programma dimostrano che la concentrazione degli analiti misurati concordava con i valori di peso. Come previsto la conduttività non equivale alla concentrazione di cloro per il semplice motivo che quando non viene utilizzato il cloruro di sodio puro per assemblare i campioni il risultato si altera. La conducibilità ha la migliore corrispondenza tra laboratori con un coefficiente di variazione (CV=3%) rispetto al cloruro (5%) a concentrazioni di 50 mmol/L. A concentrazioni inferiori a 25 mmol/L la corrispondenza tra laboratori peggiora per il cloruro (CV 8%) mentre rimane costante per la conduttività (CV 3%).

I dati del programma hanno dimostrato fin dall'inizio una performance analitica superiore della conduttività rispetto al cloruro (Livello di evidenza 3).

Le linee guida CPA<sup>(27)</sup> stabiliscono che il reparto deve partecipare ai programmi esterni di valutazione della qualità con le relative modalità operative, per certificare una soddisfacente operatività. Il UK NEQAS ha definito i limiti di una performance accettabile e in qualsiasi momento, per quanto riguarda il cloro, circa il 3 % dei laboratori può esibire valori di performance al di fuori di tali limiti. Di rassicurante c'è che solo una piccola parte dei laboratori si avvia a diventare "persistentemente a scarsa prestazione". Molto raramente un laboratorio non ha mai superato i limiti per la conduttività.

Sin dall'inizio, il programma ha osservato un miglioramento di tutte le prestazioni e per tutti gli analiti (Livello di evidenza 3)

Raccomandazioni
<ul style="list-style-type: none"><li>I laboratori devono partecipare ai programmi esterni di qualità disponibili [Grado D]</li></ul>



### 5.5 Quali sono i limiti superiori per la concentrazione di Cloro e la conduttività?

La concentrazione di cloro nelle ghiandole sudoripare non supera i 160 mmol/L<sup>(95)</sup> (Livello di evidenza 3). Le cause di concentrazioni superiori a tale limite sono errori di laboratorio, di fabbricazione o patologia inventata dall'accompagnatore<sup>(96)</sup> e pseudoipoadlosteronismo<sup>(97)</sup> (Livello di evidenza 3). Un limite superiore funzionale è stato calcolato sostituendo la concentrazione del cloro a 150mmol/L con l'equazione di regressione di Hammond dove  $\text{Cloro} = 0.974 \times \text{conduttività} - 15.2$ .<sup>(93)</sup>

Raccomandazioni
<ul style="list-style-type: none"><li>Risultati che non rispecchiano la fisiologia dovrebbero essere messi in discussione, es. cloro150mmol/L [Grado D]</li><li>Per la conduttività si potrebbe usare un limite provvisorio di 170mmol/L in attesa di ulteriori studi [Grado D]</li></ul>



### 5.6 Cosa sono le percentuali accettabili di fallimento?

Una quantità insufficiente di sudore può essere raccolta a causa o di un processo di raccolta scorretto o a causa di variabilità del soggetto quali, età (vedi sezione 2), razza e condizioni della cute. Un alta percentuale di fallimenti potrebbe suggerire una tecnica dell'operatore inefficace. Il peso (o volume) del sudore raccolto dovrebbe essere esaminato per determinare il numero di infanti da cui non può essere ottenuta una quantità di sudore adeguata, e il trend annotato(vedere la sezione 4.1.3 per la definizione di peso adeguato di sudore). Questa quota può variare nella popolazione dei pazienti. Differenze di resistenza della cute provocate dall'etnia o variazioni individuali del paziente può portare ad un campione insufficiente. Le Le Grys ha rilevato<sup>(98)</sup> una percentuale di campioni insufficienti del 4,7% nei neonati e del 1,6% negli altri gruppi d'età. I sistemi di raccolta possono modificare la performance. Hammond et al.<sup>(93)</sup> ha indicato uno 0,7% di percentuale di fallimento in campioni raccolti con garze o carta da filtro contro un 6,1% nei campioni raccolti con Wescor Macroduct®, anche se Heeley et al.<sup>(70)</sup> riportano solo un 1,4% di fallimento con quest'ultimo. Denning riporta una percentuale di fallimento del 1,9% utilizzando la ionoforesi e le garze come sistema di raccolta<sup>(57)</sup>. (Livello di evidenza 3).

Eng et al.<sup>(3)</sup> ha identificato i predittori di successo del test del sudore nei bambini nati prematuri e a termine sotto le 6 settimane di età. Nell'etnia afro-americana, un peso del bambino inferiore ai 2000g, nascita pre-termine e età gestazionale <36 settimane sono associati ad un aumentata probabilità di fallimento, anche se con un modello logistico multivariato, i soli predittori significativi erano l'etnia afro-americana e l'età post gestionale.

Parad et al.<sup>(4)</sup> hanno riportato una percentuale di fallimento del 17% alla seconda settimana di vita rispetto al 3% e 11% tra la terza e l'ottava settimana di vita.

Beuchamp et al.<sup>(99)</sup> rivisitando i test del sudore effettuati nei laboratori canadesi ha rilevato che il volume insufficiente si evidenziava in bambini con meno di 3 mesi di vita e capitava in media nel 18,3% dei test rispetto al 4,5% della restante popolazione. In accordo con Le Grys<sup>(100)</sup>, un grande centro per la fibrosi cistica ha riportato una percentuale di fallimento del 25% in pazienti di età variabile tra le 2 e le 4 settimane di vita rispetto al 3,6% delle altre fasce d'età (Livello di evidenza 2-).

La percentuale di fallimenti si riduce in caso di stimolazione e susseguente raccolta da entrambi gli avambracci<sup>(13,149)</sup>. Uno studio ha rilevato una percentuale di fallimento del 10,8% nei test eseguiti su un solo braccio rispetto al 4,1% dei test eseguiti bilateralmente<sup>(149)</sup>. (vedere sezione 3.1.2)

Il controllo della percentuale di fallimento porterà alla luce delle differenze rispetto alle raccomandazioni/standard. La conseguente implementazione dei processi per il miglioramento della qualità è stata applicata con successo tanto da ottenere un significativo calo della percentuale di fallimento in alcuni centri <sup>(164)</sup>.

Non sono state individuate prove che suggeriscano quante volte si debba ripetere un esame del sudore infruttuoso su un singolo bambino, né l'intervallo di tempo tra esami ripetuti.

Riguardo al WescorNanoduct®, Desax et al <sup>(47)</sup> hanno scoperto che nei neonati a termine il WescorNanoduct® non ha prodotto risultati il 45% delle volte durante le prime 4 settimane di vita. Nei neonati prematuri (n=14, 32-37 settimane di gestazione), il rilevamento è stato infruttuoso nel 69% dei casi. Nei neonati > 1 mese, invece, il tasso di fallimento è stato solo del 9,7% (n=237) (Livello di Evidenza 3)

#### **Raccomandazioni**

- I centri dovrebbero monitorare le percentuali di ripetizione ed investigare su qualsivoglia aumento rilevante del tasso di fallimento [Grado D]
- I prelievi di sudore non validi (cioè di peso o volume insufficiente) non dovrebbero superare il 10% della popolazione testata (con l'eccezione degli esami ripetuti e esami condotti in pazienti malati o molto giovani). Nei bambini di più di 6 mesi d'età l'obiettivo dovrebbe essere inferiore al 5% [Grado D]
- Nei bambini di età inferiore ai 6 mesi i prelievi di sudore infruttuosi non dovrebbero superare il 20% della popolazione testata [Grado D]

#### **5.7 Come andrebbe valutata la prestazione del servizio?**

La qualità degli esami del sudore si può valutare raccogliendo dati sulla media e sul range nella popolazione esaminata, sulla percentuale dei prelievi ripetuti (e a seconda dell'operatore) e sulla valutazione finale di tutti i risultati positivi e intermedi. La media e il range nella popolazione si possono calcolare per identificare qualsivoglia modifica nella metodologia d'analisi avvenuta nel corso del tempo. La valutazione qualitativa esterna è un modo importante per valutare le prestazioni (vedi sezione 5.4) (Livello di Evidenza 4).

È buona prassi clinica approfondire/verificare qualsiasi risultato positivo e intermedio (Livello di Evidenza 4).

#### **Raccomandazioni**



- La performance degli esami del sudore andrebbe riesaminata periodicamente.

Questa dovrebbe includere:

- numero di raccolta prelievi insufficiente:
  - come % agli esami totali
  - per operatore
  - % di fallimento analitica (ovvero % al di fuori dell'intervallo consentito dal CQ)
  - performance nel CEQ [Grado D]
- Il laboratorio dovrebbe operare insieme ai clinici per verificare, a intervalli regolari, i risultati degli esami del sudore, in particolare dei prelievi ripetuti, delle diagnosi e degli esiti dei risultati positivi e intermedi [Grado D]

## 6. Quali sono i valori di riferimento e i commenti interpretativi da utilizzare?

Un livello di cloruro nel sudore > a 60 mmol/L si riteneva in linea con una diagnosi di fibrosi cistica <sup>(103,104)</sup>. Il dato va comunque interpretato nel contesto dell'età e del fenotipo del paziente. La diagnosi si effettuava qualora ci fosse un livello di cloruro nel sudore > a 60 mmol/L in un paziente con una o più caratteristiche cliniche associabili al fenotipo della fibrosi cistica, un test di screening neonatale positivo o casi di fibrosi cistica in un fratello <sup>(104)</sup>. La presenza di due mutazioni del gene CFTR note per causare la FC potrebbe fornire la prova definitiva, ma la dimostrazione della presenza di mutazioni non è necessaria per porre diagnosi di FC. La diagnosi genetica di FC mediante l'individuazione di due mutazioni CFTR (note per essere associate alla malattia) non richiede conferma mediante esame del sudore, comunque il Programma di Screening Neonatale nel Regno Unito al momento richiede un esame del sudore dopo un test di screening neonatale positivo, anche in presenza di due mutazioni CFTR.

### 6.1 Quali sono i valori di riferimento e i commenti interpretativi da utilizzare per i livelli di cloruro nel sudore?

Una serie di studi ha pubblicato il range dei valori di elettroliti nel sudore per individui con e senza FC. I principali studi a seguire riportano i livelli di cloruro nel sudore in pazienti con la FC e in vari gruppi di controllo sani <sup>(105, 106, 69, 107, 68, 108, 32, 15)</sup>. Molti tra questi primi studi furono condotti anteriormente all'introduzione della genotipizzazione, per cui alcuni dei soggetti esaminati potrebbero aver sofferto di FC o di disordini legati alla FC. L'avvento dei programmi di screening sui neonati nell'ultimo decennio ha condotto a una serie di pubblicazioni che includono sia i valori di cloruro nel sudore che i genotipi. La popolazione analizzata è anche considerevolmente più giovane rispetto a quanto descritto in

precedenza <sup>(85, 109, 110, 13, 111, 112, 4, 113)</sup>. Altri studi <sup>(114)</sup> hanno esaminato i genotipi di quei pazienti che in precedenza si collocavano nella fascia intermedia del livello di cloruro nel sudore.

Un'indagine recente di Mishra et al <sup>(115)</sup> ha ulteriormente esaminato gli intervalli di riferimento dai 5 anni d'età fino all'età adulta (in soggetti sani non affetti da FC). La media dei livelli di cloruro nel sudore risultava in aumento fino a stabilizzarsi intorno ai 20 anni, ma i dati suggerivano che il limite massimo degli intervalli di riferimento del cloruro del sudore nella popolazione non-FC di 5-9 anni (n=40) era 40mmol/L, a 10-14 anni (n=40) 49mmol/L, a 15-19 anni (n=40) 53mmol/L, e a 20 anni+ (n=162) 60mmol/L. I dati suggeriscono che sia necessaria un'ulteriore valutazione degli intervalli di riferimento relativi all'età nei bambini più grandi. Senthamilarasu et al <sup>(116)</sup> hanno altresì riportato dati preliminari con livelli di cloruro nel sudore più elevati nella popolazione adulta, supportati dai dati recenti di Traeger et al <sup>(163)</sup> (Livello di Evidenza 2+).

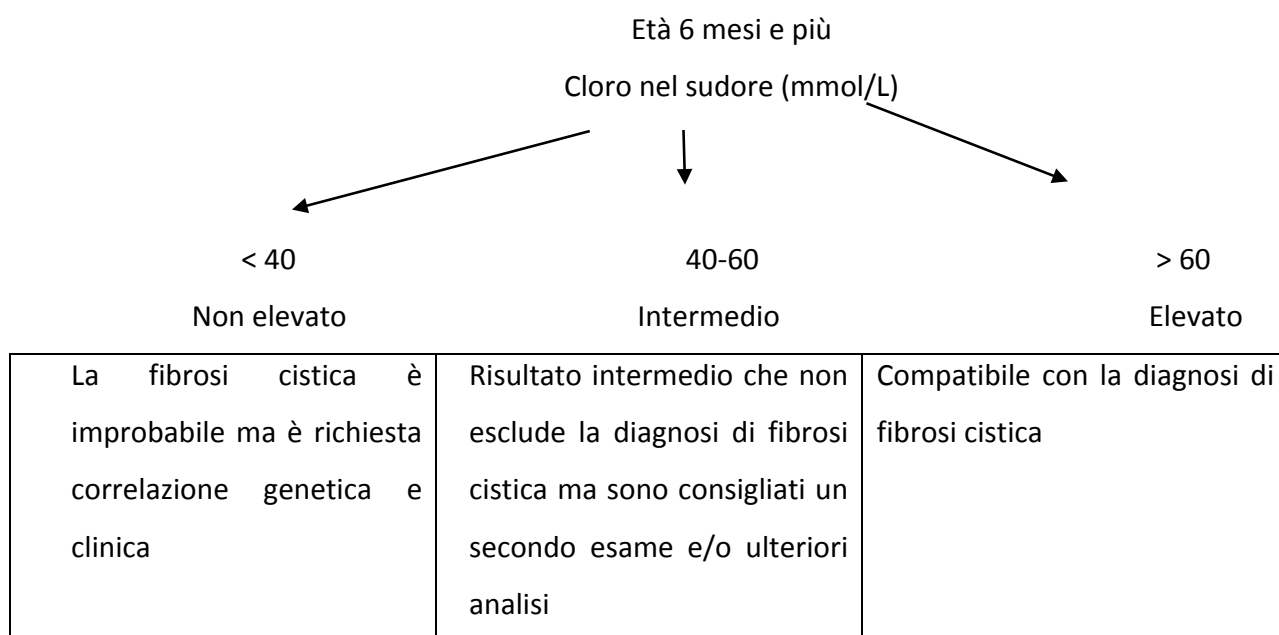
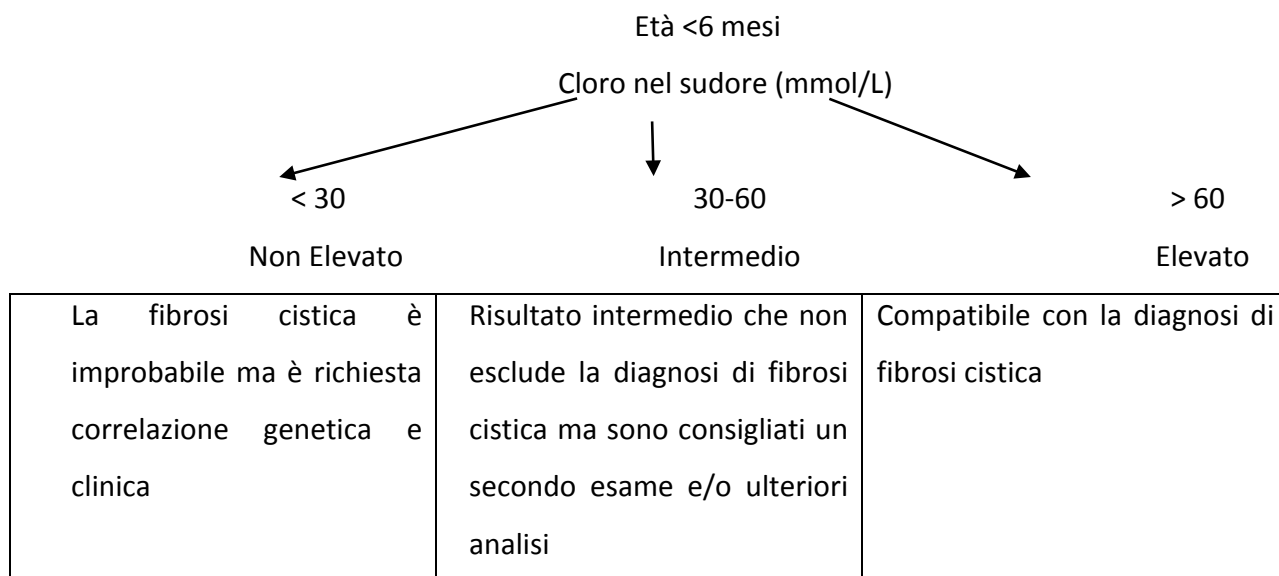
Uno studio <sup>(71)</sup> di 112 controlli combinati e 112 soggetti con fibrosi cistica dagli 0 ai 40 anni ha dimostrato un incremento statistico nel cloruro nel sudore nei bambini normali di 1-12 anni, ma nessun aumento nei bambini con fibrosi cistica. Nei soggetti normali con più di 12 anni d'età non v'erano modifiche della concentrazione di cloruro relative all'età, mentre nei pazienti con fibrosi cistica più anziani si verificava una diminuzione con l'aumento dell'età. La rilevanza dei cambiamenti relativi all'età non era tale da causare confusione diagnostica – i pazienti con fibrosi cistica di tutte le età avevano cloruro >60 mmol/L. Tuttavia, uno studio sullo screening neonatale <sup>(4)</sup> ha mostrato una diminuzione nel cloruro del sudore misurato con l'età nei neonati con IRT elevato, 1 mutazione e cloruro del sudore <30mmol/L (tra 1 e 8 settimane di età post gestazionale). L'esame dei falsi negativi in un programma di screening riportato da Padoan et al <sup>(110)</sup> ha identificato una lieve variazione nei livelli di cloruro misurato tale da rendere positivi i livelli "equivoci" – i numeri di questo studio, tuttavia, erano molto esigui (Livello di Evidenza 3).

L'esame dei dati suggerisce l'applicazione delle seguenti fasce di interpretazione dei risultati (vedere tabella)

Età	Concentrazione di cloruro nel sudore (mmo/L)	Interpretazione	Riferimenti
<6 mesi	< 30	La fibrosi cistica è improbabile ma è richiesta correlazione genetica e clinica	<b>13, 60, 85,112</b>
6 mesi e più	< 40	La fibrosi cistica è improbabile ma è richiesta correlazione genetica e clinica	<b>60, 110</b>
< 6 mesi	30-60	Risultato intermedio che richiede ulteriori valutazioni relative alla fibrosi cistica	<b>13, 60, 85, 111, 112</b>
6 mesi e più	40-60	Risultato intermedio che richiede ulteriori valutazioni relative alla fibrosi cistica	<b>60, 110</b>
Tutte le età	>60	Compatibile con una diagnosi di fibrosi cistica	<b>13</b>

Figura 1

Schema di interpretazione del cloro nel sudore



### **Raccomandazioni**

- Un livello di cloruro nel sudore di >60 mmol/L è compatibile con una diagnosi di FC [Grado C]
- Un livello di cloruro di 40-60 mmol/L, o di 30-60 mmol/L negli inferiori ai 6 mesi di età è un risultato intermedio che richiede altre analisi relative alla fibrosi cistica come un secondo esame e/o ulteriori esami [Grado C]
- Cloruro nel sudore inferiore ai 40 mmol/L (o inferiore ai 30 mmol/L nei pazienti con meno di 6 mesi d'età) rende la FC improbabile, ma richiede correlazioni genetiche e cliniche [Grado C]

## **6.2 Quali sono i valori di riferimento e i commenti interpretativi da utilizzare per la conduttività del sudore?**

Hammond <sup>(93)</sup> ha condotto uno studio di larga scala confrontando sodio, cloruro e conduttività. Il rapporto tra cloruro e conduttività mostra che una conduttività di 57 mmol/L equivale a un cloruro di 40 mmol/L, mentre il punto limite di conduttività di 50 mmol/L suggerito dalle Linee Guida CLSI <sup>(9)</sup> e dalla Cystic Fibrosis Foundation equivarrebbe a un cloruro di 33 mmol/L, comprendendo quindi gran parte della popolazione sana. Lo studio di Heeley <sup>(70)</sup>, che confronta i livelli simultanei di sodio, cloruro, conduttività e osmolalità, ha mostrato che una concentrazione di Cloruro di 33 mmol/L supera di 3SDs la media della popolazione sana. Il numero corrispondente per la conduttività è di 67 mmol/L. Una serie di 1732 misurazioni di conduttività fornita da 13 laboratori del Regno Unito ha dimostrato di concordare ampiamente con i dati pubblicati. La conduttività media dei risultati aggiustati era di 39 mmol/L. Due deviazioni standard sopra la media corrispondevano ad una conduttività di 61 mmol/L <sup>(58)</sup>. Misurazioni ripetute della conduttività del sudore in 20 neonati sani, 20 adulti sani e 15 pazienti con fibrosi cistica per stimare la variazione tra e nei soggetti, hanno supportato un punto limite di 60 mmol/L per minimizzare ripetizioni superflue, riuscendo allo stesso tempo ad individuare tutti i pazienti affetti da fibrosi cistica <sup>(102)</sup>. Uno studio recente <sup>(76)</sup>, che confronta i livelli di cloruro nel sudore e la conduttività nel sudore in 1164 pazienti (di età compresa tra i 3 giorni e gli 85 anni), ha individuato 62 risultati discrepanti, che risultavano positivi per la conduttività (>50 mmol/L) ma negativi per il cloruro nel sangue (<30 mmol/L o <40 mmol/L a seconda dell'età). La sensibilità per la conduttività del sudore ammontava al 100% a >50 mmol/L, ma il 5% dei pazienti testati per la sola conduttività necessiterebbe di ulteriori test. Si è quindi concluso che la conduttività è ammissibile come test di screening per la FC,

ma non per la diagnosi. Ogni paziente risultato positivo alla conduttività dovrebbe sottoporsi ad ulteriori test (Livello di Evidenza 2+).

Il manuale per l'utente datato 1997<sup>(139)</sup> stabilisce che la conduttività media di 33 mmol/L, superiore di 3SDs = 67 mmol/L (n=471). Si raccomanda che "la maggior parte dei valori normali sarà inferiore a 60 mmol/L, con la maggior parte dei valori positivi superiore a 90 mmol/L. Usare cautela nell'interpretare tutti i risultati che ricadono nella regione intermedia tra 60 e 90". In un aggiornamento del manuale pubblicato nell'aprile del 2000, 90 mmol/L è stato sostituito con 80 mmol/L (Livello di Evidenza 4)

Un limite massimo >90mmol/L come diagnosi di FC è supportato da dati forniti da Katherisan et al<sup>(78)</sup>, Cinel et al<sup>(77)</sup>, Lezana et al<sup>(117)</sup>, che concordano nell'attribuire una specificità del 100% a questo livello (Livello di Evidenza 2+)

#### **Raccomandazioni**

- E' improbabile che un valore inferiore ai 50 mmol/L (equivalenti NaCl) sia compatibile con la fibrosi cistica. Valori oltre 90 mmol/L sono compatibili con una diagnosi di fibrosi cistica [Grado C]
- La fibrosi cistica non andrebbe diagnosticata basandosi esclusivamente sulla misurazione della conduttività. La conferma andrebbe trovata utilizzando il cloruro del sudore e/o genotipizzazione (vedi anche Sezione 4.3.3.) in tutti i pazienti con conduttività uguale o superiore a 50 mmol/L [Grado C]

### **6.3 Qual è la variazione biologica intra-individuale degli analiti del sudore?**

#### **6.3.1 Qual è la variazione biologica intra-individuale del cloruro del sudore?**

Non ci sono molti dati disponibili sulla variazione intra individuale dei livelli di cloruro nel sudore. Koerbin et al<sup>(118)</sup> hanno condotto ripetuti esami del sudore in 4 adulti sani utilizzando il sistema WescorMacroduct® nel corso di 2 anni per determinare variazioni biologiche intra individuali del livello di cloruro del sudore. Il risultato è stato >25% in 3 soggetti, con due pazienti inclusi nella classificazione di intermedio e normale. L'imprecisione analitica (CV) ammontava a meno del 2% (livello di Evidenza 3). Mackay et al<sup>(160)</sup> hanno riportato uno studio in cui il sudore è stato prelevato da due siti nello stesso momento usando il metodo Gibson Cook, n=295), per il livello di cloruro nel sudore il CV totale è risultato del 20,2% (tra la deviazione standard appaiata 4.3 mmol/L). Nella stragrande maggioranza dei pazienti la variazione del cloruro non ha modificato l'interpretazione, nel gruppo intermedio la

classificazione sarebbe cambiata nel 48% dei casi (13 pazienti). L'imprecisione analitica riportata era 4,1% a 8,9 mmol/L di cloruro (Livello di Evidenza 2+)

### 6.3.2 Qual è la variazione biologica intra individuale della conduttività del sudore?

Van de Merwe et al <sup>(102)</sup> hanno prelevato sudore tramite il sistema WescorMacroduct® da 55 soggetti una volta alla settimana per 5 settimane. La conduttività è stata misurata usando l'analizzatore WescorSweatCheck. Il CV intra individuale nei neonati sani, negli adulti e nei pazienti di FC è risultato del 18%, 12% e 7,3% rispettivamente (Livello di Evidenza 3)

#### Raccomandazioni

- Occorre prestare attenzione alla variazione biologica intra individuale utilizzando l'interpretazione degli esami del sudore, in particolar modo in prossimità dei livelli massimi. La variazione biologica è di gran lunga superiore all'imprecisione analitica [Grado D]

### 6.4 Qual è la relazione tra cloruro del sudore intermedio e il genotipo?

Esistono numerosi casi riportati e studi che esaminano la relazione tra valore del test del sudore intermedi e il genotipo della FC <sup>(119, 120, 71, 121, 122, 123, 124,110,125,79)</sup>, molti dei quali sono associati alla FC non classica. Un'analisi approfondita di questi dati non rientra negli scopi di questo rapporto.

#### Raccomandazioni

- I pazienti che ricadono nell'area intermedia di cloruro del sangue richiedono ulteriori valutazioni cliniche da parte dei medici esperti di fibrosi cistica prima della conferma diagnostica [Grado D]

### 6.5 Quali altri disordini sono associati alle mutazioni della FC?

Sono state identificate una serie di patologie correlate alle mutazioni di una o due mutazioni del locus FC. Esse comprendono alcuni pazienti con assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti, pancreatite idiopatica e forse sinusite cronica <sup>(126, 127, 128, 129, 130)</sup>. In queste patologie i livelli di cloruro nel sudore potevano risultare intermedi o anormali. La scelta di classificare tali patologie come fibrosi cistica resta in mano al medico che ha in cura il singolo paziente. Una proposta di classificazione è stata suggerita dalla World Health Organization <sup>(131)</sup>.

## 6.6 Quali altre malattie e patologie sono associate all'incremento dei livelli di elettroliti nel sudore?

Esistono molte patologie correlate ad anormalità dei livelli di sodio e cloruro <sup>(143, 144, 145, 146)</sup>. Nella maggior parte di tali studi vengono menzionati solo uno o due pazienti, ed in molti gli elettroliti del sudore sono ritornati a valori normali una volta curate le condizioni più acute. Tra queste malattie, poche sono fenotipicamente simili alla fibrosi cistica, e di solito non rappresentano un problema nella diagnosi differenziale. Alcuni autori hanno analizzato il fenomeno <sup>(103, 132)</sup>, che non rientra negli obiettivi di queste linee guida e per il quale non vi sono raccomandazioni.

## 6.7 Quali sono le indicazioni nel ripetere un esame del sudore?

La prassi vuole che un esame del sudore si debba ripetere prima della conferma di diagnosi di FC, tuttavia, se il genotipo conferma la diagnosi di FC, un secondo esame del sudore non è necessario. Se sorge il dubbio che un esame negativo non sia coerente con il quadro clinico e che il genotipo sia inconcludente, l'esame del sudore andrebbe eseguito nuovamente. I dati di Calvin et al <sup>(125)</sup> riportano il caso di 6 neonati identificati come parte di un programma di screening con IRT elevati ma con esami del sudore normali/borderline. Test del DNA approfonditi hanno rivelato che tutti avevano mutazioni compatibili con la FC. Anche se gli esami del sudore ripetuti subito dopo hanno confermato i risultati precedenti, in un bambino gli elettroliti del sudore si sono innalzati fino a livelli da FC all'età di 2 anni. Tutti i livelli borderline di cloruro nel sudore non confermati dal genotipo andrebbero ripetuti <sup>(133, 110, 134)</sup> (Livello di Evidenza 3).

### Raccomandazioni

- Si raccomanda un secondo esame del sudore qualora il risultato dell'esame del sudore non sia in linea con il fenotipo clinico e/o il genotipo [Grado D]

## 6.8 Quali altri esami si possono intraprendere nella diagnosi di fibrosi cistica?

### (a) Analisi del Genotipo

Va oltre gli obiettivi delle linee guida e non vi sono raccomandazioni.

### (b) Misura della Differenza Potenziale Nasale

Va oltre gli obiettivi delle linee guida, ma l'opinione dominante è che la DP nasale non sia raccomandata come unico esame <sup>(135)</sup> (Livello di Evidenza 4).

## 7. Chi è responsabile per gli esami e per la formazione?



### **7.1 Chi dovrebbe eseguire l'esame del sudore – Quali sono le capacità richieste e quali sono i requisiti di formazione?**

Il prelievo del sudore può essere effettuato da una serie di diverse professionalità, che include ricercatori, medici, infermieri, flebotomisti, fisioterapisti e staff tecnico per la misurazione dell'attività respiratoria. Le procedure analitiche per la misurazione degli elettroliti del sudore sono condotte solitamente da dipartimenti di chimica clinica.

Negli esami del sudore è richiesta attenzione ai dettagli, e le cause più comuni di una diagnosi sbagliata consistono in imprecisioni durante l'esecuzione o l'interpretazione dell'esame – più prone a verificarsi quando l'esame viene condotto solo occasionalmente <sup>(86, 88)</sup>.

Shwachman e Mahmoodian <sup>(88)</sup> ritengono che il più grande errore negli esami del sudore può probabilmente imputarsi all'inesperienza del tecnico, che può avere una formazione inadeguata e che esegue gli esami poco frequentemente, forse dalle tre alle cinque volte al mese (Livello di Evidenza 4)

Nel 2006, un controllo (Audit) condotto su dei laboratori del Regno Unito ha mostrato che 20 dei 73 laboratori esaminati avevano raccolto /o analizzato meno di 50 esami del sudore durante i 12 mesi precedenti. 2 laboratori ne avevano condotti meno di 10 all'anno.

#### **Linee guida di Consenso**

Le linee guida della Cystic Fibrosis Foundation suggeriscono che gli esami del sudore debbano essere eseguiti su un numero di pazienti sufficiente da un numero ristretto di personale esperto e ben addestrato, che superi regolarmente degli esami di competenza documentati. La CLSI <sup>(9)</sup> richiede che gli esami del sudore siano condotti su un numero sufficiente di pazienti da parte di personale esperto e ben addestrato in modo da garantire la qualità del servizio. Si dovrebbe eseguire periodicamente una valutazione documentata delle competenze (Livello di Evidenza 4).

#### **UKNEQAS**

Non c'è un rapporto diretto tra carico di lavoro e performance analitica. Tuttavia, la natura stessa dei dati EQA guarda solo agli aspetti analitici, presumendo che stimolazioni prettamente tecniche e aspetti relativi alla raccolta dei protocolli d'esame del sudore siano stati effettuati senza alcun errore (Livello di Evidenza 3).

- E' probabile che la familiarità con la procedura e la frequenza delle analisi possano influenzare la prestazione. Per questo motivo, non è ammissibile che un'organizzazione o un individuo effettuino un numero eccessivamente esiguo di esami del sudore, e per garantire qualità e competenza è necessaria una quantità sufficiente ogni anno [Grado D].
- Il prelievo del sudore va effettuato da personale esperto e ampiamente qualificato:
  - i programmi di formazione dovrebbero essere completamente documentati
  - la procedura dovrebbe essere classificata come procedura operativa standard
  - dovrebbero essere condotte delle procedure di riconvalida appropriate [Grado C]
- I prelievi del sudore possono essere eseguiti da una serie di professionisti del settore sanitario [Grado C]
- L'analisi del sudore andrebbe condotta da scienziati biomedici esperti e qualificati o da scienziati clinici ampiamente addestrati con convalida regolare:
  - la formazione e i programmi di convalida andrebbero documentati nella loro interezza [Grado C]

## **7.2 Chi è responsabile delle analisi e della formazione?**

L'esame del sudore è un esame chimico e la procedura analitica è propriamente riconducibile alle competenze del dipartimento di chimica clinica. Il rispetto degli standard CPA <sup>(27)</sup> richiede che lo staff sia debitamente qualificato per il lavoro che è chiamato ad eseguire (Livello di Evidenza 4)

### **Raccomandazioni**

- Un clinico esperto o un patologo clinico esperto dovrebbero essere responsabili della formazione, valutazione di competenza e riconvalida dell'intero staff coinvolto negli esami del sudore [Grado C]
- Le responsabilità degli esami del sudore, sia di prelievo che analitiche, dovrebbero spettare a un chimico clinico esperto (o equivalente) e dovrebbero essere comprese nella loro totalità da tutti gli operatori e utenti; è opportuno introdurre un meccanismo, pienamente condiviso, che permetta di riportare qualsivoglia dubbio riguardante la prestazione [Grado C]

## BIBLIOGRAFIA

1. Harpin VA, Rutter N. Sweating in preterm infants. *J. Pediatr.* 1982; 100:614-618
2. Hardy JD, Davison SHH, Higgins MU and Polycarpou PN. Sweat tests in the newborn period. *Arch. Dis. Child.* 1973; 48: 1041-43
3. Eng W, Le Grys VA, Shechter MS, Laughon MW and Barker PM. Sweat testing in preterm and full-term infants less than 6 weeks of age. *Pediatr.Pulmonol.* 2005; 40: 64-67
4. Parad RB, Comeau AM, Dorkin HL, Dovey M, Gerstle R, Martin T, O'Sullivan BP. Sweat testing infants detected by cystic fibrosis newborn screening. *J. Pediatr.* 2005; 147: S69-S72
5. Littlewood JM. The Sweat Test. *Arch. Dis. Child.* 1986; 61; 1041-43
6. MacLean WC and Tripp RJ. Cystic fibrosis with oedema and falsely negative sweat test. *J. Pediatr.* 1973; 83:86-88
7. Brand PLB, Gerritsen J. Van Aalderen WMC. A baby with eczema and an abnormal sweat test. *Lancet* 1996; 348: 932
8. Williams J, Griffiths PD, Green A, Weller PH. Sweat tests and Flucloxacillin. *Arch. Dis. Child.* 1988; 63: 847-8
9. LeGrys VA, Applequist, R, Briscoe DR, Farrell, P, Hickstein R, Lo SF, Passarell R, Rheinheimer DW, Rosenstein BJ, Vaks JE . CLSI. Sweat testing: sample collection and quantitative chloride analysis; approved guideline. Third edition, Clinical and Laboratory Standards Institute C34-A3 (ISBN 1-56238-713-8, ISSN 0273-3099) 2009. CLSI 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898, USA
10. 10 R Jayaraj, D Lacy, J Ellison. Does an information leaflet prepare parents for a sweat test? Results of aquestionnaire.- *Journal of Cystic Fibrosis*, 2006 Vol: 5, Issue: 1, S93
11. 11 Tluczek A, Koscik RL, Modaff P, Pfeil D, Rock MJ, Farrell PM, Lifchez C, Freeman ME, Gershan W, Zaleski C, Sullivan B. Newborn screening for cystic fibrosis: parents' preferences regarding counselling at the time of infants' sweat test. *J Genet Couns.* 2006 Aug;15(4):277-91
12. 12 Bignell M and Griffiths PA National Audit of the UK Sweat Testing Guidelines Birmingham Children's Hospital (personal communication) February 2006
13. 13 Massie J. Clements B and the Australian Paediatric Respiratory Group. Diagnosis of Cystic Fibrosis after Newborn Screening: The Australasian experience – Twenty years and five million babies later: A consensus statement from the Australasian Paediatric Respiratory Group *Pediatr. Pulmonol.* 2005; 39: 440-446

14. 14 National standard protocol for newborn screening for cystic fibrosis. UK Newborn Screening Programme Centre, CF Screening Programme Guidelines for clinical referral. Pub. 21 October 2005 [http://newbornbloodspot.screening.nhs.uk/nat\\_std\\_cf\\_protocol](http://newbornbloodspot.screening.nhs.uk/nat_std_cf_protocol) (Accessed 18.10.11)
15. 15 National UK Laboratory Sweat Test Subgroup 2001 (see section on process of guideline development – page 74)
16. 16 Reynolds A., Great Ormond Street Hospital, London. Personal Communication.
17. 17 Foote KD, Struther S, Barbour H. Report of a new and important cause of falsely positive sweat test. *J. Cystic Fibrosis* 2008; 7 (Suppl 2): S10
18. LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ. Diagnostic sweat testing: The Cystic Fibrosis Foundation Guidelines. *J Pediatr* 2007; 151: 85-9
19. Pao C, Wallis C. Simultaneous bilateral sweat testing – two for the price of one? *J.Cystic Fibrosis* 2002; 1 (supp): 96
20. Thorpe EL, Angel PE, Samuel CT. CT Sweat Tests: Reliability of collection procedures and analysis as indicated by between limb imprecision studies. *Proc. ACB National Meeting* 2001; 102-3
21. Report of the committee for a study for evaluation of Testing for Cystic Fibrosis. *J Pediatrics* 1976; 88: 711-750
22. Schwarz V, Sutcliffe CH, Style PP. Some hazards of the sweat test. *Arch.Dis.Child.* 1968; 43: 695-701
23. Ellam SV. Improvement on the safety of sweat test equipment. *Med&Biol Eng. & Comput.* 1978; 16: 595-596
24. Instruction manual. Model 3500. Webster sweat collection system. Wescor® Inc., Logan, Utah, 1979
25. Macroduct® sweat collection system M2551-6A Model 3700-SYS instruction/service manual. Wescor® Inc, Logan, Utah, 2004
26. Gibson-Cooke Sweat Test Apparatus IPS-25 Instruction Manual, 2009. C&S Electronics Inc., 2565 16th Avenue, Columbus, NE 68601, USA
27. Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd. Standards for the Medical Laboratory Version 2.01, March 2009. 45 Rutland Park, Botanical Gardens, Sheffield, S10 2PB
28. Price CP, Spencer K. Problems associated with measuring sweat chloride concentration with an ion-specific electrode. *Ann. Clin. Biochem.* 1977;14:171-178
29. Shwachman H, Mahmoodian A. Pilocarpine iontophoresis sweat testing. Results of seven years experience. *Mod.Probl.Pediatr.* 1966; 10: 158-182

30. Webster HL, Quirante CG. Micro-flowcell conductometric sweat analysis for cystic fibrosis diagnosis. *Ann.Clin.Biochem.* 2000; 37: 399-407
31. Altmiller DH, Flux M, Parker KM. A patient requiring high concentration of pilocarpine nitrate to induce sweating. *Clin.Chem.* 1984; 30: 943
32. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23: 545-549
33. Kopito L, Schwachman H. Studies in cystic fibrosis: determination of sweat electrolytes in situ with direct reading electrodes. *Pediatrics* 1969; 43: 794-798
34. Webster HL, Barlow WK. New approach to cystic fibrosis diagnosis by use of an improved sweat induction/collection system and osmometry. *Clin.Chem.* 1981; 27: 385-387
35. Webster HL. Improved pilocarpine reservoir for use in sweat testing. *Clin.Chem.* 1982; 28: 2182-2183
36. Kirk JM. Inconsistencies in sweat testing in UK laboratories. *Arch.Dis.Child.* 2000; 82: 425-427
37. Appelbe GE, Wingfield J. Chapter 2. Medicines Act 1968. The Licensing System. P13-34 in *Pharmacy law and Ethics* 1998 (\*6th edition). The Pharmaceutical Press, London
38. The supply of unlicensed relevant medicinal products for individual patients. MCA Guidance Note 14. Revised February 2000. Policy Unit, Inspection & Enforcement Division, Medicines Control Agency, Market Towers, 1 Nine Elms Lane, London, SW8 5NQ
39. Special-order Manufacturers. British National Formulary latest edition. British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain (e.g. No. 42 September 2001, p 767)
40. Szabo LV, Kenny MA, Lee W. Direct measurement of chloride in sweat with an ion-selective electrode. *Clin. Chem.* 1973; 19: 727-730
41. Tocci PM, McKey RM V. Laboratory confirmation of the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin.Chem.* 1976; 22: 1841-1844
42. Webster HL. Laboratory diagnosis of cystic fibrosis. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1983; 18: 313-337
43. Kirk JM, Adams A, Westwood A, McCrae WM. Measurement of osmolality and sodium concentration in heated-cup sweat collection for the investigation of cystic fibrosis. *Ann. Clin.Biochem.* 1983; 20: 369-373
44. Barben J et al. Conductivity determined by a new sweat analyzer compared with chloride concentrations for the diagnosis of cystic fibrosis. *J Paediatr* 2005; 146: 183-8

45. Barben J, Casaulta C, Spinas R, Schöni MH. Sweat testing practice in Swiss hospitals. *Swiss Med Wkly* 2007; 137: 192-198
46. Losty HC, Wheatley H, Doull I. The evaluation of a novel conductometric device for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 375-381
47. Desax M, Ammann RA, Hammer J, Schöni MH, Barben J. Nanoduct sweat testing for rapid diagnosis in newborns, infants and children with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 299-304
48. Irlam AC. A memorable patient. The burnt arm. *BMJ* 1995; 310: 657
49. Rattenbury JM, Worthy E. Is the sweat test safe? some instances of burns received during pilocarpine iontophoresis. *Ann.Clin.Biochem.* 1996; 33: 456-458
50. Medical Devices Agency Safety Notice. Prevention of burns during iontophoresis (sweat testing). MDA SN 1999 (05). Hannibal House, Elephant and Castle, London, SE1 6TQ
51. Incident Reporting & Investigation Centre, Scottish Healthcare Supplies, Trinity Park House, South Trinity Road, Edinburgh, EH5 3SH. Search of Database 2000
52. Downing M. Trent Region sweat testing audit. *Sheffield Children's Hospital Metabolic Disease Newsletter* 1999; No. 24 (no page numbers)
53. Stone J. Results of South West Region sweat testing audit 1998 (unpublished). Chemical Pathology Department, Bristol Royal Infirmary, Marlborough Street, Bristol, B22 8HW
54. Simmonds E, Alfaham M, Prosser R, Penney MD. Fractional measurements of sweat osmolality in patients with cystic fibrosis. *Arch.Dis.Child.* 1989; 64:1717-1720
55. Gibson LE & di Sant'Agnese PA. Studies of salt excretion in sweat. Relationships between rate, conductivity and electrolyte composition of sweat from patients with cystic fibrosis and from control subjects. *J.Pediatrics* 1963;62: 855-867
56. Schwarz V, Simpson NIM, Ahuja AS. Limitations of diagnostic value of the sweat test. *Arch.Dis.Child.* 1977; 52: 870-874
57. Denning CR, Huang NN, Cuasay LR, Shwachman H, Tocci P, Warwick WJ, Gibson LE. Co-operative study comparing three methods of performing sweat tests to diagnose cystic fibrosis. *Pediatrics* 1980; 66: 752-757
58. Enquiries via ACB bulletin board and via UKNEQAS 2001
59. LeGrys VA. Stability of chloride in sweat testing. *Clinical Laboratory Science* 1993; 6: 156-7
60. Farrell PM et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Paediatr* 2008; 153: S4-S41

61. Fahie-Wilson MN, Freedman DB. North West Thames audit of sweat test procedure and analysis, 1995 (unpublished). Biochemistry Department, Southend Hospital, Prittlewell Chase, Westcliff-on-Sea, SSO ORY
62. Kirk J, Department of Paediatric Biochemistry, Royal Hospital for Sick Children, Sciennes Road, Edinburgh, EH9 1LF. Personal communication 2001
63. Gilbert CJ et al. The sweat test: effect of elution time on chloride and sodium concentrations. *Ann ClinBiochem* 2005; 42: 400-401
64. Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80
65. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning & characterisation of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73
66. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-65
67. Gleeson M, Henry RL. Sweat sodium or chloride? *ClinChem* 1991; 37: 112
68. Green A, Dodds P, Pennock C. A study of sweat sodium and chloride, criteria for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann ClinBiochem* 1985; 22: 171-6
69. Hall SK, Stableforth DE, Green A. Sweat sodium and chloride concentrations – essential criteria for the diagnosis of cystic fibrosis in adults. *Ann ClinBiochem* 1990; 27: 318-20
70. Heeley ME, Woolf DA, Heeley AF. Indirect measurements of sweat electrolyte concentration in the laboratory diagnosis of cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2000; 82: 420-4
71. Kirk JM, Keston M, McIntosh I, Al Essa S. Variation of sweat sodium and chloride with age in cystic fibrosis and normal populations: further investigations in equivocal cases. *Ann ClinBiochem* 1992; 29: 145-52
72. Shwachman H, Mahmoodian A, Neff RK. The sweat test: sodium & chloride values. *J Pediatr* 1981; 98: 576-8
73. MacKenzie F.. Sweat testing scheme 2009 UKNEQAS, Wolfson EQA Laboratory PO Box 3909 Birmingham B15 2UE
74. Cystic Fibrosis Foundation Center Committee. Memo to Center Directors, May 30, 1996
75. Losty H (All Wales Clinical Chemistry Audit Group). A Welsh Standard for Sweat Testing (version 2) 1999. Department of Medical Biochemistry, University of Wales, Cardiff
76. Hickstein R, Benford S, Mueller O. Chloride vs conductivity: A comparison of results obtained from the simultaneously testing of sweat for cystic fibrosis *ClinChemProc AACC Annual Meeting* 2008;54:6 suppl.A-142



77. Cinel G, Gurcan N, Dogru D, Yalcin E, Cobanoglu N, Pekcan S, Ozcelik U, Kiper N. Sweat conductivity measurement with Macroduct coil system for cystic fibrosis. *J. Cystic Fibrosis* 2006;5:S105
78. Katherisan N, Gupta A, Mumford S, Cade A, Jones R. Sweat conductivity for the diagnosis of cystic fibrosis. *J. Cystic Fibrosis* 2004;3:205
79. Kirk J, Department of Paediatric Biochemistry, Royal Hospital for Sick Children, Sciennes Road, Edinburgh, EH9 1LF. Personal communication 2009
80. Weissman N, Pileggi VJ. Inorganic ions: determination of chloride. In: Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, eds. *Clinical Chemistry: principles & technics*. London: Harper & Row 1974: 712-20
81. Barbour HM. Development and evaluation of the simultaneous determination of sweat sodium and chloride by ion-selective electrodes. *Ann ClinBiochem* 1991; 28: Pt.2 150-4
82. Northall H, York SA. Sweat sodium chloride analysis using BM Hitachi 911 ion-selective electrodes. *BJ Biomed Science* 1995; 52: 68-70
83. Frey MJ. A quantitative colorimetric method for the determination of serum chloride using the Technicon RA 1000 system. *ClinChem* 1983; 29: 1255
84. Hukelmann M, Oster O. Mercurimetric determination of chloride in sweat, *ClinChimActa* 2002; 319: 75-76
85. Jayaraj R et al. A reference interval for sweat chloride in infants aged between five and six weeks of age. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 73-78
86. Smalley CA, Addy DP and Anderson CM. Does that child really have Cystic Fibrosis? *The Lancet*, 1978, 415-416
87. David TJ and Phillips BM. Overdiagnosis of Cystic Fibrosis. *The Lancet*, 1982, 1204-1205
88. Shwachmon H and Mahmoodian A. Quality of Sweat Test Performance in the Diagnosis of cystic Fibrosis. *Clin.Chem.* 1979; 25: 158-161
89. Le Grys V.A. Sweat analysis proficiency testing for cystic fibrosis. *Pediat.Pulmonology*, 2000; 30: 476-48
90. Rosenstein BJ, Langbaum TS. Misdiagnosis of Cystic fibrosis. *Clin.Pediatr.* 1987; 26: 78-82
91. Le Grys VA, Wood RE. Incidence and implications of false negative sweat test reporting in patients. *Paediatric Pulmonology*, 1988; 4; 169-172
92. Ayers GJ. *Pathology 2000 Abstracts*. Use of Vitros Direct ISE slides to measure sodium and chloride for the diagnosis of cystic fibrosis

93. Hammond KB, Turcias NL, Gibson LE. Clinical evaluation of the Macroduct sweat collection system and conductivity analyser in the diagnosis of Cystic Fibrosis. *J. Pediatr* 1994; 124; 255
94. Finlay MacKenzie. Sweat Testing Surveys. Unpublished data 2001. UK NEQAS, Wolfson EQA Laboratory, P.O. Box 3909, Birmingham, B15 2UE
95. Schulz JJ. Micropuncture studies of the sweat formation in CF patients. *J.Clin.Invest.* 1969; 48: 1470-7
96. Orenstein DM, Wasserman AL. Munchausen syndrome by proxy simulating cystic fibrosis. *Paediatrics* 1986; 78: 621-4
97. Hall SK. Personal communication 2002. Department of Clinical Chemistry, Birmingham Children's Hospital, Steelhouse Lane, Birmingham, B4 6NH
98. Le Grys VA. Sweat Testing for Cystic Fibrosis: Profiles of Patients with Insufficient Samples. *Clin.Lab.Science* 1998; 6: 73-75
99. Beauchamp, M. , Grey, V. and Lands, L.C. Sweat collection for testing in Canadian Cystic Fibrosis Centers, is it optimal? *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 934-937
100. Le Grys VA. Assessment of Sweat-Testing Practices for the Diagnosis of Cystic Fibrosis. *Arch.Path.&Lab.Med.* 2001; 125:11 1420-1424
101. LeGrys. V.E. *Laboratory Medicine* January 2002, No.1, Vol 33, p55
102. van der Merwe D-E, Ubbink JB , Delport R, Becker P, Dhatt GS, Vermaak WHH. Biological variation in sweat sodium chloride conductivity. *Ann. Clin. Biochem.* 2002; 39: 39-43
103. Rosenstein BJ. In *Cystic Fibrosis*. Hodson ME and Geddes DM. Arnold 1999, London
104. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *The Journal of Pediatrics* 1998; 132: 589- 595
105. Farrell PM, Kosciak RE. Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for F508 cystic fibrosis. *Paediatrics* 1996; 97: 4
106. The cystic fibrosis genotype - phenotype consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Eng J Med* 1993;329: 1308-13
107. Davis PB, Rio DS, Muntz JA, Dieckman L. Sweat chloride concentration in adults with pulmonary diseases. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 34-37
108. di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA et al. Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease. *Am J Med* 1953;15: 777-784
109. Taccetti G, Festini F, Braccini G, Campana S, de Martino M Sweat testing in newborns positive to neonatal screening for cystic fibrosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89:F463-464

110. Padoan R, Bassoti A, Seia M, Corbetta C. Negative sweat test in hypertrypsinemic infants with cystic fibrosis carrying rare CFTR mutations. *Eur. J Pediatr* (2002) 161;212-215
111. Sontag MK, Hammond KB, Zielenski J, Wagener JS, Accurso F. Two-tiered immunoreactive trypsinogen-based newborn screening for cystic fibrosis in Colorado: screening efficacy and diagnostic outcomes. *J Pediatr* 2005;147:S83-S88
112. Parad RB and Comeau AM. Diagnostic dilemmas resulting from the Immunoreactive trypsinogen/DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm. *J. Pediatr* 2005;147:S78-S82
113. Soltan ZN, Foster MM, Newman NB, Anbar RD Sweat chloride testing in infants as heterozygote carriers by newborn screening. *J Pediatr* 2008;153:857-9
114. Lebecque P, Leal T, De Boeck C, Jaspers M, Cuppens H, Cassiman JJ Mutations of the cystic fibrosis gene and intermediate sweat chloride levels in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:757-761
115. Mishra A, Greaves R, Smith K, Carlin JB, Wootton A, Stirling R, Massie J. Diagnosis of cystic fibrosis by sweat testing: age-specific reference intervals (2008) *J. Pediatrics*;153:758-63
116. Senthilarasu P, Jayaraj R, Jakka S, Grime C, Vadalamudi N, Barton P, Isherwood D, Southern KW. Establishing sweat salt levels in normal healthy adults (2008) *J. Cystic Fibrosis* 7(Suppl 2) S10;35
117. Lezana JL, Vargas MH, Karam-Bechara J, Aldana RS, Furuya MEY. Sweat conductivity and chloride titration for cystic fibrosis diagnosis in 3834 subjects. *J Cystic Fibrosis* 2003;2:1-7
118. Koerbin G, Greaves RF, Robins H, Farquar J, Hickman PE Total intraindividual variation in sweat sodium and chloride concentrations for the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin.Chim.Acta* 2008; 393:128-129
119. Desmarquest P, Feldmann D, Tamalat A et al. Genotype analysis and phenotypic manifestations of children with intermediate sweat chloride test results. *Chest* 2000; 118: 1591-1597
120. Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A, Gorvoy JD, Quittell L, Friedman KJ, Silverman LM, Boucher RC and Knowles MR. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N.Engl.J.Med* 1994; 331; 974-80
121. Gilfillan A, Warner JP, Kirk J et al. P67L: a cystic fibrosis allele with mild effects found at high frequency in the Scottish population. *J.Med.Gent.* 1998;35: 122-125
122. Stewart B, Zabner J, Shuber AP, Welsh MJ, McCray PB. Normal sweat chloride values do not exclude the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 899-903

123. Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D et al. Correlation of sweat chloride with clones of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation. *J Pediatr* 1995; 127: 705-10
124. Massie RJ, Wikcken B, Van Asperen P et al. Pancreatic function and extended mutation analysis in  $\Delta$ F508 heterozygotes infants with an elevated immuno-reactive trypsinogen but normal sweat electrolyte levels. *J Pediatr* 2000; 137: 214-20
125. Calvin J, Heeley AF, Iles R, Upton C, Hogg SL, Gould J. Six cases of cystic fibrosis with neonatal hypertrypsinemia and normal or equivocal sweat test results. *Proc. ACB National Meeting* 2003;72
126. Chillon M, Casals T, Mercier B et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995;332: 1475-1480
127. Mak V, Zielinski J, Tsui LC et al. Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. *JAMA* 1999; 6: 2217-2224
128. Cohen JA, Friedman KJ, Noone PG et al. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Eng J Med* 1998; 339: 653-658
129. Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Eng J Med* 1998; 339: 645-52
130. Wang XJ, Moylan B, Leopold DA et al. Chronic sino sinusitis in CF heterozygotes. *PedPulmonol* 1999; 19: 91-92
131. Report of a joint World Health Organisation, International Cystic Fibrosis (Mucoviscidosis) Association and European Cystic Fibrosis Thematic Network meeting, June 2000. Classification of Cystic fibrosis and Related Disorders. WHO Secretariat, Boulyjenkow, Victor: World Health Organisation, Department of Management of Non-Communicable Diseases, Human Genetics Programme, CH 1211, Geneva, Switzerland.
132. Duddy RM, Scanlin TF. Abnormal sweat electrolytes in a case of celiac disease and a case of psychosocial failure to thrive. *ClinPediatrics* 1987; 26:83-89
133. Da Silva Filho LVF, Bussamra MHCF, Nakaie CMA, Adde FV, Rodrigues JC, Raskin S, Rozov T. Cystic Fibrosis with normal sweat chloride concentration – case report. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* 2003; 58:260-262
134. Feldmann D, Coudere R, Audrezet M-P, Ferec C, Bienvenu T, Desgeorges M, Claustres M, Mittre H, Blayau M, Bozon D, Malinge M-C, Monnier N, Bonnefont J-P, Iron A, Bieth E, Dumur V, Clavel C, Cazeneuve C, Girodon E. CFTR genotypes in patients with normal or borderline sweat chloride levels. *Human Mutation, Mutations in Brief* 2003 #654 online

135. Sweat Test Guideline Review Open Meeting (2009) Birmingham Children's Hospital
136. Royal College of Paediatrics and Child Health. Standards for Development of Clinical Guidelines and Implementation in Paediatrics and Child Health. 3<sup>rd</sup> Edition 2006
137. Scottish Intercollegiate Guideline Network (2000) A guideline developers' handbook. *SIGN 50*
138. Wescor® Inc, Biomedical Systems. Nanoduct® neonatal sweat analysis system – specifications.<http://www.wescor.com/biomedical/cysticfibrosis/nanoduct.html> Accessed May 2010
139. Model 3120 Sweatcheck conductivity analyser users manual, WescorInc, Logan, Utah. Effective 5 Aug, 1997
140. UK Newborn Screening Programme Centre . Cystic fibrosis is suspected leaflet <http://newbornbloodspot.screening.nhs.uk/cms.php?folder=2460> posted 19.3.09 accessed May 2010
141. Guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis in the UK. (2003) [www.acb.org.uk](http://www.acb.org.uk)
142. Pillon DJ and Meezan E. Liquid-chromatographic determination of chloride in sweat from cystic fibrosis patients and normal persons. *Clin Chem.* 1985 31;1155-1157
143. Beck R, Goldberg E, Durie PR, Levison H. Elevated sweat chloride levels in anorexia nervosa. *J. Pediatr.* 1986 108;260-262
144. Rodrigues MESM, Melo CB, Reis FJC, Penna F J. Concentration of electrolytes in the sweat of malnourished children. *Arch. Dis. Child.* 1994 71;141-143
145. Ruddy RM and Scanlin TF. Abnormal sweat electrolytes in a case of celiac disease and a case of psychosocial failure to thrive. *Clin. Pediatr.* 1987 26;83-89
146. Christoffel KS, Lloyd-Still JD, Brown G, Schwachman H. Environmental deprivation and transient elevation of sweat electrolytes. *J. Pediatr.* 1985 107;231-234
147. <http://www.pat-testing.info/frequency.htm> (viewed 17.5.11)
148. Mullen K. Sweat sample stability test protocol and final report (2008) Wescor®, Inc, USA
149. Jarvis S. Department of Clinical Biochemistry, NHS Lanarkshire. Personal Communication
150. Performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis 2003 <http://www.rcpch.ac.uk/rcpch-guidelines-and-standards-clinical-practice>
151. Green A, Kirk J and Guidelines Development Group. Guideline for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann. Clin. Biochem.* 2007 44;25-34

152. Baumer JH. Evidence based guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis in the UK. *Arch. Dis. Child.* 2003 88;1126-7
153. Green A. The sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis- a personal experience of guideline production. *Ann. Clin. Biochem.* 2007 44;20-24
154. Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://genet.sickkids.on.ca/app> Accessed 31.8.11
155. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;i:307-310
156. Wheatley, H (2011) Department of Medical Biochemistry, Cardiff and Vale University Hospital. Personal communication
157. MacKenzie F. UK NEQAS for Sweat Testing Scheme Organiser (February 2009). Data provided regarding laboratory participation
158. Yilmaz K, Tatli, B, Yaramis A, Aydinli N, Caliskan, M, Ozmen, M (2005) Symptomatic and asymptomatic hypohidrosis in children under topiramate treatment. *Turk. J Pediatr* 47;359-363
159. Proesmans, M (2011) Personal communication. Consultant in Pediatric Pulmonology, Leuven, Belgium
160. Mackay R J, Florkowski C M, George P M, Sies CW and Woods S. Uncertainty of sweat chloride testing: does the right hand know what the left hand is doing? (2008) *Ann. ClinBiochem.* 45;535-538
161. Goldberg S, Schwartz S, Francis M, Stankiewicz H et al. Does sweat volume influence the sweat test result? (2010) *Arch Dis Child* 95;377-381
162. Sands D, Oltarzewski M, Nowakowska A and Zybert K. Bilateral sweat tests with two different methods as a part of cystic fibrosis newborn screening (CF NBS) protocol and additional quality control (2010) *Folia Histochemica et Cytobiologica* 48;358-365
163. Traeger N, Shi Q and Dozor AJ. Relationship between sweat chloride, sodium, and age in clinically obtained samples. (2013) *J Cystic Fibrosis* (in press) Available online 2 August 2013
164. Boas SR, Hageman J, Washburn J, Piasecki S, Liveris M. Results of a quality improvement program for sweat testing to diagnose cystic fibrosis (2012) *Lab Med.* 43(4):12-14
165. Gugliani L, Sitwat B, Kurland G, Weiner DJ. Elevated sweat chloride concentration in children without cystic fibrosis who are receiving topiramate therapy (2012) *Pediatric Pulmonology* 47;429-433

# PROCESSO DI REVISIONE DELLE LINEE GUIDA

## METODOLOGIA

Le Linee Guida sono state pubblicate per la prima volta nel 2003 (141). La revisione delle Linee Guida è avvenuta tra il 2008 e il 2014. La metodologia utilizzata nel processo di revisione è illustrato di seguito. Il processo di revisione della linea guida è sintetizzato nella Figura 2.

### **Gruppo di revisione della linea guida**

E' stato creato un gruppo di revisione multidisciplinare della linea guida. Il gruppo includeva professionisti della salute di discipline scientifiche, cliniche ed infermieristiche provenienti da diverse organizzazioni di stakeholders. I dettagli di tutti i membri e delle organizzazioni di stakeholders sono elencati all'inizio del documento. Ad ogni membro del gruppo era assegnata una o più sottosezioni della linea guida da rivedere. L'assegnazione era basata sulla competenza specifica in quell'area.

### **Definizione dell'obiettivo**

Il gruppo di revisione della linea guida ha approvato un obiettivo in un meeting iniziale.

### **Identificare le evidenze**

Sono stati usati diversi meccanismi per identificare le evidenze, inclusa la ricerca computerizzata della letteratura, la ricerca manuale, la ricerca puntuale, la revisione delle linee guida esistenti basate sulle consensus e le evidenze identificate dal UK Laboratory Sweat Test Subgroup sin dalla linea guida iniziale nel 2003 e le evidenze identificate successivamente attraverso una ricerca più ampia.

### **Revisione delle evidenze**

Le evidenze e le raccomandazioni per il test del sudore sono state suddivise in 7 sottosezioni (vedi obiettivo). Per ogni sottosezione almeno 2 membri del gruppo di revisione della linea guida si occupavano della revisione e del livello di evidenza. In un meeting del gruppo di revisione della linea guida le sottosezioni venivano discusse ed ottenevano un consenso informale al fine di produrre una bozza della linea guida.

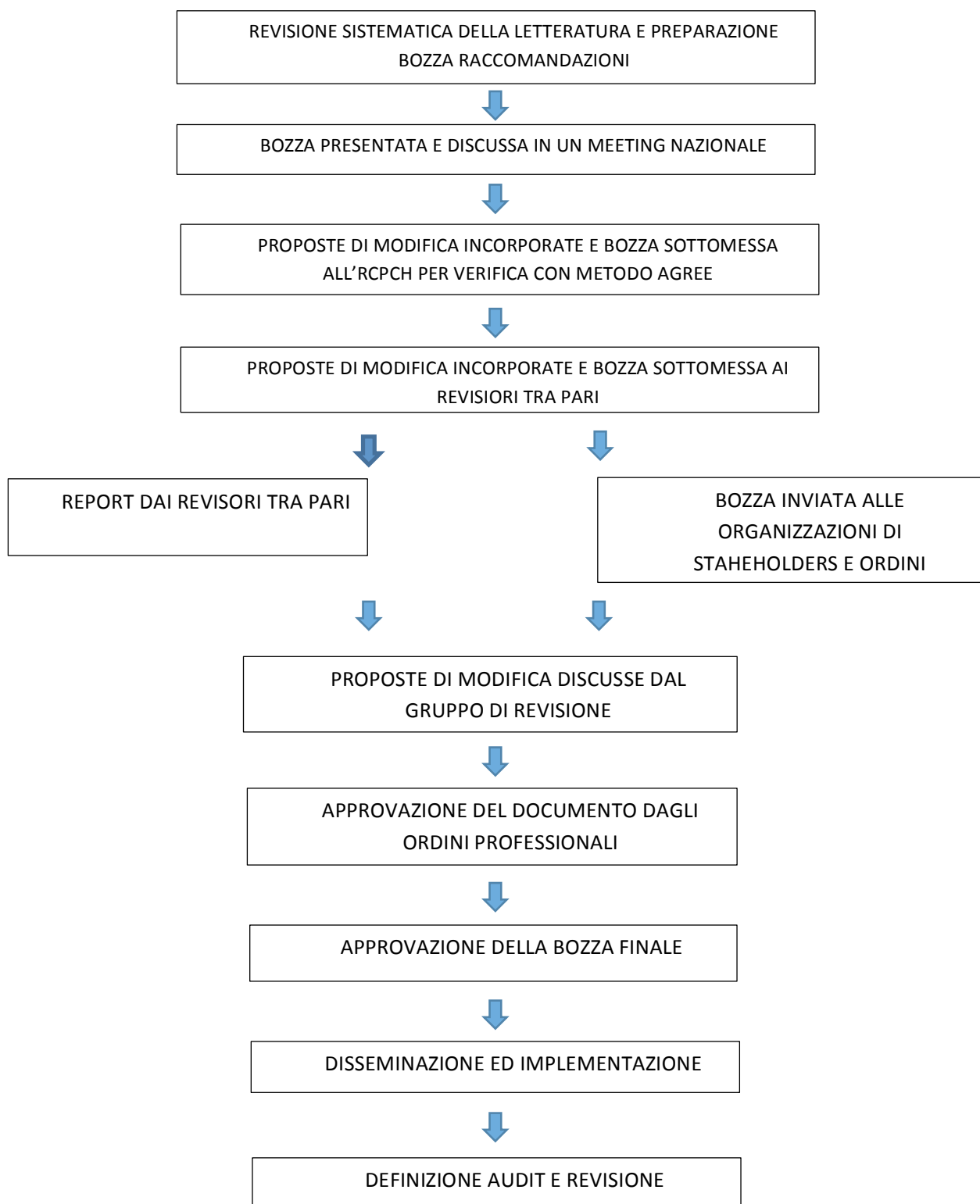
### **Consultazione**

La prima bozza della linea guida revisionata è stata presentata in un meeting aperto a commenti e a discussione e le proposte di modifica sono state incorporate ove appropriato. La linea guida è stata quindi sottoposta alla verifica con il metodo AGREE da parte dell'RCPCH. Una seconda bozza è stata inviata alle organizzazioni ed ai soggetti elencati all'inizio del documento. Di nuovo le proposte di modifica sono state incorporate ove appropriato.

### **Disseminazione**

La linea guida revisionata sarà distribuita agli ordini professionali e resa disponibile online.

Figura 2. Processo di revisione della Linea Guida





### **Classificazione delle evidenze e raccomandazioni**

Il gruppo di sviluppo delle linee guida ha effettuato una revisione sistematica delle evidenze in accordo con il metodo SIGN e le evidenze e le raccomandazioni sono state valutate in accordo a questo metodo (i,ii,iii,iv). Il sistema di grading del SIGN è stato rivisto così alcune evidenze/raccomandazioni sono state modificate rispetto al documento del 2003.

Altre modifiche sono state:

- La pubblicazione di un documento non è essenziale per essere considerata di buona evidenza
- Poiché non è etico effettuare studi clinici controllati (randomizzati o altro) per valutare la variabilità nella performance del test del sudore, ci sono pochi dati che posso qualificare le evidenze come grado I o II
- La formulazione delle raccomandazioni è stata raggiunta attraverso un consenso informale nel gruppo di lavoro
- Il grading di tutte le evidenze è stato rivisto dagli stessi 2 membri del gruppo di lavoro che hanno assicurato la coerenza di tutto il documento

### **Schema di classificazione delle raccomandazioni**

I criteri per il grading delle raccomandazioni in questo document si basano su quelli usati negli “Standard per lo sviluppo delle linee guida cliniche e l’implementazione in pediatria” prodotte dal Royal College of Pediatrics and Child Health <sup>(136)</sup>, e si basano sullo Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) <sup>(137)</sup> dove il livello di evidenza è usato per determinare il grado della raccomandazione.

## Livelli di evidenza

Livello	Classificazione dell'evidenza (SIGN 2000 <sup>137</sup> )
1++	Evidenza da meta analisi di alta qualità, revisioni sistematiche di RCT o RCT con un rischio molto basso di bias
1+	Evidenza da meta analisi ben condotte, revisioni sistematiche di RCT o RCT con basso rischio di bias
1-	Evidenza da meta analisi, revisioni sistematiche di RCT o RCT con 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 casualità e una moderata probabilità che la relazione sia casuale
2+	Evidenza da studi caso-controllo o studi di coorte ben condotti con un basso rischio di confondimento, bias o casualità ed un moderato rischio che la relazione non sia causale
2-	Evidenza da studi caso-controllo o studi di coorte con alto rischio di confondimento, bias o casualità ed un significativo rischio che la relazione non sia causale
3	Evidenza da studi non-analitici (Es: case reports, case series)
4	Evidenza dall'opinione di esperti

## Forza delle raccomandazioni

Forza	Tipo di raccomandazione (SIGN 2000 <sup>137</sup> )
A (livello 1++)	Richiede almeno una meta analisi o un RCT di livello 1++ e direttamente applicabile alla popolazione target e che dimostri una coerenza complessiva dei risultati
B (livelli 1++, 1+ e 2++)	Richiede un corpo di evidenza che includa almeno studi di livello 2++ e direttamente applicabile alla popolazione target e che dimostri una coerenza complessiva dei risultati o evidenza extrapolata da studi di livello 1++ o 1+
C (livelli 2+ o 2++)	Richiede un corpo di evidenza che includa almeno studi di livello 2+ e direttamente applicabile alla popolazione target e che dimostri una coerenza complessiva dei risultati o evidenza extrapolata da studi di livello 2++
D (livelli 2+, 3 o 4)	Livello di evidenza 3 o 4 o evidenza estrapolata da studi di livello 2+

Il processo di sviluppo delle raccomandazioni ha seguito le indicazioni dell'RCPCH<sup>(136)</sup>; ulteriori dettagli li trovate nella sezione che tratta il processo di sviluppo delle linee guida.

## Bibliografia

- i. SIGN Guidelines: Standards for development of Clinical Guidelines in Paediatrics and Child Health 3rd Edition (2006) Royal College Paediatrics and Child Health ISBN:1 900954 97 4.
- ii. The guideline development process: an overview for stakeholders, the public and the NHS 3rd edition (April 2007) National Institute for Health and Clinical Excellence
- iii. Royal College of Paediatrics and Child Health. Standards for Development of Clinical Guidelines and Implementation in Paediatrics and Child Health. 3<sup>rd</sup> Edition 2006
- iv. Scottish Intercollegiate Guideline Network (2000) A guideline developers' handbook. *SIGN* 50

## REVISIONE SISTEMATICA

Il processo di ricerca comprendeva le diverse strategie di ricerca elettronica usate per la versione 1 e per la versione 2 della linea guida:

Strategia di ricerca elettronica per la versione 1 della linea guida (2003).

Ricerca dei database computerizzati.

Medline 1965-2001, studi umani, bambini 0-18 anni, tutti i tipi di revisioni, meta-analisi, ricerche su test del sudore, editoriali, studi clinici, lettere, ecc.

Durante la revisione della linea guida alter 4 ricerche sono state effettuate – mostrate sotto. In tutti i casi le pubblicazioni non in lingua Inglese poiché la traduzione dell'intero testo non sarebbe stata disponibile. Tutti gli articoli erano su umani così da essere direttamente comparabili con la popolazione da sottoporre al test e non richiede estrapolazione da altre specie o assunzioni da dati *in vitro*.

Strategia di ricerca elettronica per la versione 2 della linea guida (terminata a Marzo 2014, aggiornamento della versione 1 del 2003)

1. May 2008 : (January 2000 to May 2008), Medline, The Cochrane library, Cinahl, Embase (1996 - Maggio 2008), NLH Specialist Libraries, PubMed usando le seguenti component del PICO: Pazienti = tutti i bambini; intervento = test del sudore; Confronto = nessuno; Outcome = fibrosi cistica, test diagnostico.

Parole chiave e termini di ricerca usati erano:

Patient - Newborn(s), Baby, Babies, Infant(s), Child(s), Children, Childhood, Adolescent(s), Adolescence  
Intervention – Sweat, Sweat test(s), Sweat testing, Sweat chloride test(s), Sweat chloride testing, Sodium chloride, Chloride(s), Sodium

Comparison – None

Outcome - Cystic fibrosis, CF, Diagnosis laboratory, Diagnostic test routine, Diagnostic accuracy, Diagnostic procedure, Laboratory test, Clinical laboratories, Neonatal assessment, Neonatal screening  
English Language only, Humans only

2. June 2009: (da gennaio 2008 – giugno 2009) Medline, The Cochrane Library, Cinahl, Embase, PubMed, Google Scholar, Zetoc

3. October 2010: (dal 1970 al 2000) Cinahl, 1965-2000 Embase, The Cochrane Library pre-2000. Queste ricerche precedenti sono state intraprese per affrontare le inadeguatezze nella prima linea guida.

Le ricerche 2 e 3 usavano la seguente formula del PICO: Pazienti = come prima; Interventi = sudore, sudare, ghiandole sudoripare, test del sudore, cloro nel sudore, test del sloro nel sudore, sodio nel

sudore, elettroliti nel sudore, iontoforesi pilocarpinica; Confronto = nessuno; Outcome = fibrosi cistica, FC

4. Novembre 2013: (da gennaio 2009 a novembre 2013). Medline, The Cochrane Library, Cinahl, Embase, PubMed and Google Scholar. Queste ulteriori ricerche sono state intraprese per catturare ogni nuova pubblicazione prima della finalizzazione della linea guida. Come per le precedenti ricerche (vd. 3 soprattutto) sono state usate le stesse intestazioni del PICO

Altre ricerche eseguite:

- Ricerca manuale
  - libri e riviste
  - revision della letteratura assemblata da parte di un gruppo di esperti
  - articoli selezionati pre 1965
  - contatti epersonali con esperti riconosciuti a livello Nazionale ed internazionale - UK, USA, Australia
- Ricerca specifica

Per particolari sezioni del report, sono state effettuate specifiche ricerche come dettagliato sotto:

Raccolta del sudore

1. articoli pubblicati sul test del sudore combinato con Published articles on sweat test combined with:

- Iontoforesi
- ustioni
- orticaria
- apparato
- attrezzatura

2. revision dei dati raccolti da 30 centri per un workshop sul test del sudore (Association of Clinical Biochemists National Meeting 1998 e UK

National External Quality Assessment Schemes Workshop 1998) e dati di audit raccolti da 73 laboratori nel 2006 nell'ambito del Sweat Test Guidelines Group in collaborazione con lo UKNEQAS (sponsorizzato da ACB)<sup>(12)</sup>

3. Wescor® manuale utente (Webster sweat collection system model 3500 1979; Macroduct® sweat collection system model 3700, Sweat Chek™ 3120, Nanoduct®, Patient Simulator) e sito web (<http://www.wescor.com>)

4. Dati raccolti da inchieste via internet (Association for Clinical Biochemistry Mailbase 2009) e contatti personali con colleghi in UK e USA

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

## Analisi del sudore

1. ricerche con termini MeSH per il test del sudore.

Nessuna corrispondenza esattam ad eccesione per:

Sweat

Sweating

Gland, Sweat

Testing

Ricerche su: Iontophoresis, burns, urticaria, equipment and supplies hanno usato una combinazione di termini MeSH e parole chiave o parole di ricerca testuale.

2. indagini della UK National External Quality Assurance Schemes Sweat Test External Quality Assurance

## Qualità

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

2. dati del UK National External Quality Assessment Schemes da indagini <sup>(12)</sup>

- Review of existing Consensus Based Guidelines
  - CLSI 2009 <sup>(9)</sup>
  - Welsh Sweat Standard 1999 <sup>(28)</sup>
- National UK Laboratory Sweat Test Subgroup <sup>(15)</sup>
  - include le evidenze dal “consesso di esperti” raccolte dal National UK Laboratory Subgroup <sup>(141)</sup>

## Verifica della qualità delle evidenze

I dati individuati dalle ricerche computerizzate ed altre ricerche sono circolati tra 4 membri del gruppo di revisione (ricerca 1) per la valutazione della rilevanza per il processo di test del sudore.

I membri hanno assegnato un punteggio alla letteratura in modo indipendente per stabilire se era necessario valutare un articolo per intero. Non era necessario se, per esempio, la letteratura era:

- Non rilevante per il processo del test del sudore
- Era già stata valutata per la prima linea guida

- Era una review senza alcuna evidenza originale
- Era principalmente legata a studi di genotipo

Sono state registrate brevemente le ragioni per la non inclusione. Le risposte sono state tabulate e gli articoli in full-text sono stati identificati come rilevanti, così come gli articoli dove era impossibile valutare la pertinenza. Nei casi in cui c'è stata una scissione nell'assegnazione del punteggio, se il punteggio era 2:2 o 3:1 veniva richiesto l'intero articolo. A causa della minore quantità di letteratura identificata durante la seconda ricerca, questa è stata valutata solo da 2 membri. Tutti gli articoli full text sono stati forniti a tutti i membri del gruppo di revisione. Durante la revisione della letteratura, i dati sono stati valutati e valutati con il metodo SIGN 2000<sup>(137)</sup> per valutare la qualità delle evidenze.

## **IMPLICAZIONI ATTESE DELLA NUOVA LINEA GUIDA**

Le modifiche introdotte in questa linea guida, non si ritiene avranno un impatto significativo per i dipartimenti e lo UK Trust che offrono un servizio di test del sudore.

Anzi, il tentativo di aumentare la competenza nel garantire un servizio di qualità ha ridotto la necessità di definire un numero minimo di prove tale che si può mantenere la fornitura di questo servizio in tutto il Regno Unito e di conseguenza ridurre la necessità per i pazienti di affrontare lunghi viaggi per eseguire il test.

La documentazione di competenza nello svolgimento del test del sudore rispecchia i requisiti per l'accreditamento dei laboratori e quindi dovrebbe richiedere solo una piccola formazione supplementare. La revisione degli intervalli di riferimento rispecchierà meglio la popolazione servita e aiuterà i centri che effettuano lo screening neonatale per la fibrosi cistica. L'aumento del tempo di conservazione del sudore prima dell'analisi (4.1.1) chiarisce la posizione per quei centri nei quali la fornitura di un servizio analitico completo non sarebbe redditizio, inoltre giustifica la raccolta in loco (un vantaggio per il paziente tramite riduzione dei tempi di viaggio) e il rinvio dei campioni di sudore per l'analisi ai centri di eccellenza.

L'importanza della revisione dei risultati/esiti e dei tassi di fallimento del test e fallimento è ribadita e questo dovrebbe agevolare la revisione della fornitura di servizi. I provider dovrebbero rivedere il carico di lavoro e se lavorare secondo le linee guida determinare se l'invio dei pazienti e/o dei campioni di sudore per l'analisi può fornire un servizio più efficiente.

Potenziali fattori facilitanti

La governance è sempre più importante all'interno del NHS e le linee guida forniranno un supporto a quei principali servizi di test del sudore per garantire un approccio coerente al test e all'analisi. Si ritiene che la ristrutturazione e la riprogettazione dei servizi dell'NHS attualmente in corso sosterranno la revisione dei servizi che effettuano il sudore e potranno aumentare l'invio dei campioni di sudore a centri di riferimento.

#### Potenziali barriere

C'è la possibilità che centri che hanno un alto tasso di fallimenti nella raccolta del sudore o quelli con un carico di lavoro molto basso, al fine di dimostrare una competenza costante, continueranno ad offrire il servizio, piuttosto che trovare fornitori alternativi o lavorare con centri di eccellenza per aumentare la performance.

Il test del sudore da solo non può essere usato per diagnosticare la fibrosi cistica e questo può impattare sui servizi che utilizzano il sistema WescorNanoduct®.



## **Appendice 1**

### **Foglio informativo sul test del sudore (Cystic Fibrosis Trust)**

#### **Introduzione**

Il test del sudore è un test utilizzato per la diagnosi di fibrosi cistica (FC). Questa scheda informativa spiega come funziona il test, perché è utilizzato e che cosa significano i risultati.

#### **Che cos'è il test del sudore?**

Il test del sudore misura l'ammontare di sale (generalmente misurato come Cloro) nel sudore. Questo viene fatto collezionando una piccola quantità di sudore dal braccio, o qualche volta dalla parte superiore della gamba, in un bimbo piccolo.

#### **Perché viene utilizzato?**

Nelle persone con FC vi è un problema nel trasporto del Cloro attraverso le membrane cellulari. Questo provoca maggiori concentrazioni di Cloro (come sale) nel sudore paragonate a quelle di chi non ha FC. Così, se è presente una familiarità o una possibilità di FC, il test del sudore è parte di speciali test che aiutano a fare, o ad escludere, una diagnosi di FC. Lo screening per FC è parte del programma nazionale di screening neonatale. Il test del sudore viene eseguito in quei bimbi sospettati di avere FC, come parte del follow up del processo di screening. Come componente delle indagini per la ricerca di possibili cause della malattia, il test del sudore potrebbe essere eseguito nei bambini senza familiarità di FC ma che presentano numerose infezioni polmonari, diarrea inspiegabile, o nei bambini che non mettono peso o non crescono normalmente. In queste circostanze il test è spesso utilizzato per escludere una diagnosi di FC. E' inoltre utile in accertamenti per adulti con problemi come bronchiectasie, infertilità e pancreatiti.

#### **Come viene eseguito il test?**

Una piccola area di pelle sul braccio o sulla gamba viene pulita con acqua, e 2 gel o 2 tamponi speciali vengono apposti. Questi gel/tamponi contengono una sostanza chiamata pilocarpina, la quale fa sudore la pelle. Per far andare sottocute la pilocarpina, l'area viene stimolata tramite una bassa corrente di batteria per circa 5 minuti. Questo potrebbe provocare una sensazione di pizzicorio ma non brucia e non fa male.

I gel/tamponi vengono rimossi, la pelle viene pulita e un piccolo dispositivo a spirale o un pezzo di carta speciale viene appoggiato sul braccio/gamba. Il sudore viene collezionato all'interno del dispositivo a spirale o sulla carta per circa 20-30 minuti. Il sudore collezionato viene poi inviato al laboratorio per l'analisi. L'intero test generalmente occupa circa 30 minuti.

La zona del braccio o della gamba che è stata stimolata potrebbe restare arrossata per qualche ora dopo il test, ma questo è normale e nulla di cui preoccuparsi. Il test è molto sicuro e il rischio di qualche tipo di problema è estremamente basso.

Occasionalmente è necessario ripetere il test se si è raccolto un campione di sudore insufficiente o se sono avvenute contaminazioni. Questo non significa che il tuo bimbo abbia più possibilità di avere la FC. Tuttavia, a volte si ottiene un risultato di cloro dubbio, e si rende necessaria la ripetizione del test.

### **Il risultato del test del sudore**

Il risultato del test del sudore generalmente è disponibile per te o per il dottore che l'ha richiesto, alcuni giorni dopo l'esecuzione. Il test può aiutare il tuo dottore a decidere che cosa ci sia di sbagliato ma anche a relazionarlo ai sintomi o ai risultati di altri tests.

Se il tuo bambino ha eseguito il test a causa del risultato del test di screening neonatale, le implicazioni dei risultati del test del sudore ti saranno spiegate da un medico del centro FC, come facenti parte del follow up dai risultati dello screening – questo avviene generalmente entro le 24 ore.

Se tu avessi dubbi sul perché il test sia stato eseguito, dovresti chiederlo al tuo dottore. Non devi telefonare al laboratorio per avere i risultati. Il personale del laboratorio non è autorizzato a darti i risultati al telefono, poiché potrebbero non conoscere la storia clinica di uno specifico paziente.

### **Ulteriori informazioni**

L'associazione FC fornisce informazioni sulla FC attraverso la nostra scheda informativa, volantini e altre pubblicazioni. La maggior parte delle nostre pubblicazioni possono essere scaricate dal nostro sito web.

## Appendice 2a

### Esempio di procedure operative standard per il test del sudore eseguito con Wescor Macroduct®

#### Raccolta

##### Introduzione:

La FC è la più comune patologia genetica grave nei Caucasic, con una incidenza in UK di circa 1:2500 nati vivi. Il difetto primario colpisce il trasporto di ioni cloro attraverso le membrane cellulari, producendo secrezioni esocrine estremamente viscosi. I sintomi maggiormente rappresentativi sono difetto di crescita, infezioni respiratorie ricorrenti e insufficienza pancreatica risultante in malassorbimento. L'aumentata secrezione di cloro (e in misura minore di altri ioni) nel sudore è alla base del test diagnostico.

##### Principio:

La pilocarpina è trasferita ad una piccola zona di ghiandole sudoripare sul braccio attraverso iontoforesi. Il sudore stimolato prodotto da questa area è direttamente collezionato nel Macroduct per analisi del cloro.

SOSTANZE PERICOLE E NATURA DEL PERICOLO:

#### RIFERIRSI PER CIASCUNA ALLE LINEEGUIDA PER I LABORATORI COSHH

Pilocarpina	<b>tossica</b>
Sudore	<b>rischio biologico</b>
Elettrodi	<b>bruciorE</b>

##### Precauzioni:

Lavare le mani prima e dopo la procedura.

In caso di contatto della pilocarpina con occhi, bocca o grandi aree di pelle, risciacquare con abbondante acqua la superficie interessata.

Controllare gli elettrodi prima di ogni test. Sostituirli se mostrano segni di PITTING o di deformazione.

Non utilizzare dischetti di pilogel scaduti, rotti o che mostrano segni di deterioramento. Non abbandonare mai il paziente durante la iontoforesi e indagare qualsiasi denuncia di pizzicore o di bruciore. Alla fine del test l'area stimolata apparirà arrossata. Se c'è evidenza di vesciche o bruciate cercate assistenza medica.

##### Requisiti del paziente e del campione:

Realistici risultati del test del sudore sono maggiormente ottenuti quando il test è eseguito da un operatore di esperienza. SOLO personale addestrato nell'uso del sistema Wescor dovrebbe eseguire questo test.

Il test del sudore dovrebbe essere rimandato in bambini inferiori ai 7 giorni di vita o ai 2 kg di peso, in soggetti disidratati, sistematicamente indisposti o che presentano edema od eczema marcati. Il test del sudore non dovrebbe essere eseguito in soggetti in terapia con ossigeno in sistema aperto (questo non implica terapia in ossigeno tramite mascherina o forcelle nasali).

#### **Strumenti e apparati:**

1. Sistema di raccolta del sudore Wescor (modello 3700). Controllare i seguenti componenti: (a) stimolatore di sudore (scatola di alimentazione), (b) set di elettrodi (rosso e nero) con braccialetti in velcro, (c) braccialetti in velcro di misure diverse, adatti Macroduct, (d) strumento estrattore del sudore o siringa con ago smussato a forbici o tronchesino.
2. Tubi o coppette sigillabili per il trasporto e lo stoccaggio del sudore. Es. coppette o tazzine autoanalizzatore, o coppette per PCR da 200 ul, o provette da emocromo da 100 ul e blocco di carta da filtro
3. Tamponi
4. Garze o cotone sterili
5. Etichetta adesiva per identificazione del campione.

#### **Reagenti:**

1. Macroduct test kit. WescorCat codice SS-032 consistente in 12 dischetti di pilogel e 6 sensori. Venduti in accordo alle istruzioni del produttore.
2. Acqua deionizzata o distillata.

#### **Procedura:**

1. Controllo delle condizioni dello stimolatore di sudore (alimentatore), connessioni ed elettrodi. Effettuare le procedure di routine descritte nel manuale delle istruzioni
2. Spiegare la procedura al paziente o ai genitori. In base ai protocolli locali questo potrebbe includere il rilascio di un volantino per il paziente. I pazienti potrebbero aver già ricevuto un volantino al momento della prenotazione del test.
3. Versare acqua deionizzata o distillata in un contenitore pulito ed immergervi il cotone o le garze.
4. Chiedere al genitore/tutore di rimuovere i vestiti del paziente per esporre il braccio o l'alternativa zona di collezione del campione. Entrambe le braccia possono essere utilizzate.

5. Selezionare la zona per la iontoforesi. La parte superiore dell'avambraccio è quasi sempre la zona di maggior soddisfazione. Entrambe le braccia possono essere utilizzate. La pelle dovrebbe essere asciutta e senza rughe e non dovrebbe essere lesionata o irritata. Nei bimbi molto piccoli, con area insufficiente sugli avambracci, possono essere utilizzate come zone di raccolta la parte superiore del braccio o la parte esterna della coscia.
6. Tamponare la zona selezionata con una garza immersa in acqua distillata o deionizzata. Asciugare con una garza pulita.
7. Umidificare la pelle con una garza inumidita in acqua distillata o deionizzata per assicurare un buon flusso di corrente.
8. Posizionare un dischetto di gel in ogni elettrodo e ruotare il dischetto in modo da assicurare un buon contatto.
9. Legare entrambi gli elettrodi in posizione. La collezione del sudore avviene all'elettrodo rosso (positivo). Selezionare questo sito in modo da dare il miglior contatto possibile per il Macroduct, cioè il più lontano possibile dal polso, sulla zona con maggior tessuto sottocutaneo. Assicurarsi che gli elettrodi siano distanziati di almeno 2 cm in modo da prevenire qualsiasi ponte di corrente sulla superficie della pelle tra di loro. Se necessario l'elettrodo negativo può essere posizionato sulla parte esterna dell'avambraccio, o sulla parte superiore del braccio.
10. Seguire le istruzioni del produttore per eseguire la iontoforesi. Le istruzioni seguenti si applicano all'attuale modello 3700: premere il bottone controllo su posizione CORSA (I) e tenere momentaneamente finché si sente un breve "beep". Un tono costante indica eccessiva resistenza esterna, una rottura nella linea o batterie scariche. Se necessario, girare il tasto di controllo sullo STOP (0) e correggere il guasto prima di procedere. Se tutto è nella norma, l'indicatore di flusso della corrente raggiunge la massima lucentezza in circa 20 secondi, e diminuisce in brillantezza durante gli ultimi 5 secondi di iontoforesi poiché la corrente viene ridotta a zero. Dopo che la iontoforesi è completa un cinguettio suonerà brevemente e il verde indicatore di flusso di corrente si spegnerà.
11. Rimuovere gli elettrodi dal braccio. Generalmente l'area stimolata è visibilmente più rosea o arrossata. Risciacquare l'area sottostante all'elettrodo rosso (positivo) utilizzando una garza inumidita in acqua distillata o deionizzata. Fare questo almeno per tre volte e quindi asciugare l'area con una garza.
12. Aprire il pacchettino contenente il Macroduct. Mantenere la superficie ricoperta con la plastica, infilarlo sul braccialetto in velcro (NB: faccia peloso verso fuori).

13. Immediatamente posizionare il Macroduct sul braccio del paziente a livello dell'area stimolata. Attenzione a non pizzicare quando chiudete. Per bimbi piccoli o altri soggetti che potrebbero disturbare la campionatura, fissare il Macroduct in posizione con una benda elastica.
14. Srotolare la manica del bimbo a lasciare il Macroduct in posizione per 20 minuti. Potrebbe essere più lungo se un sudore insufficiente (meno di 2 turni = circa 15 ul) è stato collezionato dopo 20 minuti ma non dovrebbe mai essere più lungo di 30 minuti. Sebbene suggerito nel manuale di istruzioni del produttore, aumentare il tempo di raccolta oltre i 30 minuti non aumenta il peso di sudore collezionato in modo significativo.
15. Etichettare la provetta con il nome del paziente e il numero di laboratorio
16. Lasciando il Macroduct in posizione sul braccio, rimuovere la copertura di plastica. Attaccare lo strumento di estrazione (terminale bianco) al terminale esterno della bobina e disfare. Non agitare il tubo dispenser poiché questo potrebbe causare perdita di sudore. Tagliare la bobina e chiudere il Macroduct quanto più possibile. Inserire il terminale tagliato in una coppetta da PCR e poi agitare lo strumento di estrazione per trasferire il sudore, evitando le bolle. Rimuovere lo strumento di estrazione dal liquido facendo prima pressione sul tubo. Ritagliare la coppa e mantenerla in posizione dritta.
17. Il volume minimo accettabile di sudore corrispondente a  $1 \text{ gr/m}^2/\text{min}$  è 12 ul o mg per un tempo di raccolta di 20 minuti, oppure 18 ul o mg per un tempo di raccolta di 30 minuti. (vedi linee guida 4.1.3) questo potrebbe essere accertato in modo approssimativo usando l'inserito del pacchetto Macroduct. La pesatura non è necessaria, ma se preferito potrebbe essere accertata trasferendo il sudore in una coppa PCR etichettata e ripesata immediatamente. Valutare l'adeguatezza dei campioni di sudore immediatamente dopo la campionatura. Campionature inferiori a 12 ul o mg in 20 minuti o a 18 ul o mg in 30 minuti non dovrebbero essere analizzate. Il tempo di campionatura deve essere preso in considerazione per la valutazione dell'adeguatezza. Estendere il tempo di campionatura nel tentativo di aumentare il rendimento aumenta anche il volume minimo richiesto. Poiché la produzione del sudore decade rapidamente dopo 30 minuti, una campionatura insufficiente a 30 minuti è altamente improbabile che aumenti in volume in modo sufficiente da avere una campionatura adeguata per un tempo maggiore di 30 minuti. Campionature insufficienti di sudore non dovrebbero essere unite per raggiungere un sufficiente volume per l'analisi. La prova completa del sudore dovrebbe essere ripetuta.
18. Se l'analisi non viene condotta immediatamente, o se il campione deve essere trasportato in un luogo diverso per l'analisi, è raccomandato che il sudore sia trasferito in un tubo di vetro

etichettato. Un vuoto d'aria dovrebbe essere lasciato ad entrambe le estremità, le quali vanno poi sigillate con parafilm.

### **Analisi del sudore**

#### **Principio:**

Il sudore prodotto è collezionato direttamente nel Macroduct e analizzato per il cloro (anche la conduttività del sudore potrebbe essere misurata). Il cloro nel sudore dovrebbe essere misurato tramite una procedura coulometrica, elettrodo ione selettivo o colorimetrica.

#### **Sostanze pericolose e natura del pericolo:**

sudore umano	pericolo biologico
prodotti chimici	usare il metodo appropriato

#### **Precauzioni:**

Evitare contaminazione o evaporazione del campione di sudore.

#### **Requisiti del campione:**

Ritornati in laboratorio procedere all'analisi immediatamente o trasferire in una provetta di vetro da 100 ul (o in altri contenitori di dimensione appropriata). Sigillare le estremità con parafilm ed etichettare con nome del paziente e numero di laboratorio. Conservare per massimo 72 ore prima dell'analisi.

#### **Strumenti e apparecchi:**

Appropriati alla metodologia locale. Vedere SOPs

#### **Reagenti:**

Appropriati alla metodologia locale. Vedere SOPs

#### **Norme:**

Il metodo dovrebbe essere standardizzato usando materiali in commercio o interni alle appropriate concentrazioni per i campioni di sudore, ad esempio 0-150 mmol/L. la linearità e sensibilità del metodo deve essere determinata per stabilire il suo range di lavoro. Il limite di rilevazione dovrebbe essere determinato per ogni analita misurato. Non dovrebbe essere maggiore di 10 mmol/L.

#### **Controllo di qualità interno:**

Due concentrazioni di materiale di controllo di qualità interna dovrebbero essere analizzate con ogni seduta di campione di sudore. Una concentrazione dovrebbe essere nel range di normalità, e la seconda nel range intermedio o oltre la norma. Queste possono essere preparazioni commerciali o galeniche.

#### **Procedura:**

1. Campionare direttamente dalla tazza analizzatrice o segnare le estremità del tubo in vetro e con attenzione aprirlo. Dopo la campionatura, trasferire il restante sudore in una tazza da PCR o in un tubo di vetro e sigillare le estremità
2. Preparare in doppio i campioni di sudore e i materiali di controllo di qualità interni per l'analisi. Questo deve includere qualsiasi pre-diluizione del campione di sudore.
3. Analizzare gli IQC e i campioni di sudore. Se qualche risultato fuoriesce dal range di lavoro del metodo, deve essere ripetuto ad una appropriata diluizione.

**Calcolo:**

Calcolare la concentrazione di cloro nel sudore, tenendo conto di ciascun fattore di diluizione. Tutti i calcoli devono essere controllati indipendentemente.

**Limiti accettabili del controllo di qualità interno:**

I risultati dell'IQC dovrebbero essere all'interno dei limiti definiti localmente. I metodi dovrebbero essere in grado di produrre un CV entro il lotto inferiore al 5% per il cloro (ad una concentrazione di 40-50 mmol/L) e al 2% per la conduttività (ad una concentrazione di 50 mmol/L). Limiti accettabili per IQC dovrebbero riflettere questo.

**Referto:**

Il referto dovrebbe riportare:

- I. Identificazione completa del paziente
- II. Data e ora del test e data e ora della refertazione
- III. Risultati analitici (cloro, conduttività) in mmol/L. dovrebbe essere esplicitato nel referto quale analita (analiti) sono stati misurati – intervalli di riferimento
- IV. Interpretazione dei risultati, basati sugli intervalli di riferimento sottolineati nella sezione 6 di queste linee guida, e qualsiasi altra informazione circa il paziente (per esempio sufficienza pancreaticata, mutazioni cf atipiche, etc.)
- V. Raccomandazioni per la ripetizione del test se necessario:
  - Paziente con stimolazione del sudore non idonea
  - Campionatura insufficiente
  - Risultati al di sopra della norma o di dubbio
  - Risultati non fisiologici, per esempio Cloro >150 mmol/L, conduttività >170 mmol/L.

**Bibliografia**

Instructions Manuals – Macroduct Sweat Collection System appropriate to model used.

Medical Devices Agency. Safety Notice: Prevention of burns during iontophoresis MDA SN1999 (05).



Guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis in yhe UK  
(version 2).

## Appendice 2b

### Esempio di procedure operative standard per il test del sudore eseguito con carta da filtro per la campionatura secondo metodo di Gibson e Cooke

#### Campionatura del sudore

##### Introduzione:

La FC è la più comune patologia genetica grave nei Caucasic, con una incidenza in UK di circa 1:2500 nati vivi. Il difetto primario colpisce il trasporto di ioni cloro attraverso le membrane cellulari, producendo secrezioni esocrine estremamente viscosi. I sintomi maggiormente rappresentativi sono difetto di crescita, infezioni respiratorie ricorrenti e insufficienza pancreatica risultante in malassorbimento. L'aumentata secrezione di cloro (e in misura minore di altri ioni) nel sudore è alla base del test diagnostico.

##### Principio:

La pilocarpina è trasferita ad una piccola zona di ghiandole sudoripare sul braccio attraverso iontoforesi. Il sudore stimolato prodotto da questa area è collezionato su carta da filtro per analisi del cloro.

SOSTANZE PERICOLE E NATURA DEL PERICOLO:

#### RIFERIRSI PER CIASCUNA ALLE LINEEGUIDA PER I LABORATORI COSHH

Pilocarpina	<b>tossica</b>
Elettrolita catodo	<b>potenzialmente tossico</b>
Sudore	<b>rischio biologico</b>
Elettrodi	<b>bruciore</b>

##### Precauzioni:

Lavare le mani prima e dopo la procedura.

In caso di contatto della pilocarpina con occhi, bocca o grandi aree di pelle, risciacquare con abbondante acqua la superficie interessata.

Controllare gli elettrodi prima di ogni test. Sostituirli se mostrano segni di PITTING o di deformazione. Non utilizzare dischetti di pilogel scaduti, rotti o che mostrano segni di deterioramento. Non abbandonare mai il paziente durante la iontoforesi e indagare qualsiasi denuncia di pizzicore o di bruciore. Alla fine del test l'area stimolata apparirà arrossata. Se c'è evidenza di vesciche o bruciature cercare assistenza medica.

##### Esigenze del paziente e del campione:

Realistici risultati del test del sudore sono maggiormente ottenuti quando il test è eseguito da un operatore di esperienza. SOLO personale addestrato nell'uso del sistema Wescor dovrebbe eseguire questo test.

Il test del sudore dovrebbe essere rimandato in bambini inferiori ai 14giorni di vita o ai 2 kg di peso, in soggetti disidratati, sistematicamente indisposti o che presentato edema od eczema marcati. Il test del sudore non dovrebbe essere eseguito in soggetti in terapia con ossigeno in sistema aperto (questo non implica terapia in ossigeno tramite mascherina o forcelle nasali).

#### **Strumenti e apparecchi:**

1. Carta da filtro priva di sodio e cloro, esempio Whatman N°41/42/44/541, di misura uguale ai supporti degli elettrodi. Campioni di carta da filtro dovrebbero essere controllati circa i livelli di cloro prima dell'utilizzo.
2. Contenitori a tenuta stagna per pesatura ed eluizione della carta da filtro, esempio contenitori Universal.
3. Bilancia da laboratorio con sensibilità di 0.0001 gr.
4. Alimentazione elettrica per iontoforesi, per esempio C& IS Electronics Gibson – Cooke Power Supply
5. 2 elettrodi
6. Braccialetti di velcro o di gomma per gli elettrodi di misura variabile
7. Supporti per i tamponi per esempio tamponi di HL BPC plain 500 gram piegati per fornire 4-8 spessori (maggiori di 1 cm). Il tampone dovrebbe essere di almeno 1 cm più grande da ogni lato rispetto all'elettrodo per prevenire il contatto tra elettrodo e pelle. Potrebbe essere incorporato in strutture formate per contenere l'elettrodo e prevenire il contatto con la pelle.
8. Tamponi medicali
9. Fiocchi di cotone
10. Salviette di carta
11. Contenitore idoneo per la conservazione di acqua distillata o deionizzata per il lavaggio, per esempio Traysin
12. 2 contenitori adatti per mantenere in ammollo il tampone nella soluzione elettrolitica, per esempio Gallipots
13. Pinze di plastica
14. Foglio di materiale impermeabile largo almeno più di 1 cm da tutte le dimensioni rispetto alla carta da filtro, per esempio politene o parafilm
15. Cinghie impermeabili, per esempio Sleek o Setonplast.

**Reagenti:**

- (1) Soluzione di nitrato di pilocarpina (0.2-0.5%). Grado farmaceutico
- (2) Elettrolita catodo, se diverso per esempio solfato di magnesio. Grado farmaceutico
- (3) Acqua deionizzata o distillata.

**Procedura:**

1. Controllare visivamente l'alimentatore, le connessioni e gli elettrodi. Portare a termine ogni procedura descritta nel manuale di istruzioni.
2. Deve essere usata una etichetta per il contenitore. Usando una pinzetta inserire la carta da filtro nel contenitore. Mettere a zero la bilancia e registrare il peso del contenitore e della carta da filtro in esso contenuta fino a 4 decimali.
3. Trasportare il contenitore e la carta da filtro pesati in una borsa di politene.
4. Posizionare la garza del supporto elettrolita in un contenitore. Aggiungere la soluzione di pilocarpina per saturare la garza.
5. Posizionare la seconda garza del supporto elettrolita in un contenitore separato. Aggiungere la soluzione di pilocarpina o di una soluzione elettrolita al catodo alternativa per saturare la garza.
6. Spiegare la procedura al paziente/genitori. In base al protocollo locale questo potrebbe includere fornire un volantino al paziente. I pazienti dovrebbero aver già ricevuto un volantino insieme all'appuntamento.
7. Mettere dell'acqua deionizzata in un contenitore pulito ed immergervi il cotone.
8. Chiedere al genitore/tutore di rimuovere i vestiti per esporre il braccio o la zona alternativa per la campionatura. Entrambe le braccia possono essere utilizzate.
9. Selezionare le zone per la iontoforesi. La parte interna dell'avambraccio è quasi sempre la zona migliore. La pelle dovrebbe essere asciutta e senza grinze e non dovrebbe essere rotta o irritata. Nei bambini molto piccoli, con area insufficiente sull'avambraccio, la parte superiore del braccio o la coscia possono essere utilizzati come zona di campionatura.
10. Tamponare l'area selezionata con un tampone e poi con cotone imbevuto di acqua deionizzata. Asciugare con una garza pulita.
11. Inumidire la pelle con un panno imbevuto di acqua distillata per assicurare un buon flusso di corrente.
12. Posizionare il tampone imbevuto di pilocarpina con il braccialetto rosso (positivo). Poiché la campionatura di sudore avverrà in questa posizione, scegliere la miglior superficie possibile, cioè lontano dal polso, su un'area con il migliore tessuto sottocutaneo.
13. Posizionare la garza con la soluzione elettrolita del catodo e il braccialetto nero (negativo).

14. Assicurarsi che gli elettrodi siano sufficientemente lontani da evitare ponti di corrente sulla porzione di pelle compresa tra di loro. Asciugare la pelle tra gli elettrodi con un panno. Se necessario l'elettrodo negativo può essere posizionato sulla superficie esterna dell'avambraccio o sulla parte superiore del braccio.
15. Controllare la posizione di entrambi gli elettrodi e i tamponi e che ci sia un sufficiente margine di tampone ben saturato attorno ad entrambi gli elettrodi in modo da prevenire contatto tra pelle ed elettrodo.
16. Connettere gli elettrodi alla scatola per la iontoforesi.
17. Positivo (rosso)= pilocarpina, negativo (nero)=elettrolita catodo.
18. Accendere e impostare la corrente a 0.5 mA.
19. Lentamente (ogni 10-15 secondi) girare la corrente fino a 4 mA. Per un tempo di 5 minuti. A causa dell'elevata resistenza della pelle di alcuni pazienti, in genere adulti, può succedere che suoni l'allarme di sicurezza ad una corrente appena inferiore ai 4 mA. Se avviene questo controllare tutte le connessioni e riposizionare i tamponi e gli elettrodi. Se il problema persiste, prendere nota di quale cut-off di corrente lo provoca e terminare la iontoforesi ad una corrente leggermente inferiore a questo punto.
20. Lentamente (ogni 10-15 secondi) ridurre la corrente, e spegnere.
21. Rimuovere gli elettrodi e i tamponi dal braccio. Generalmente l'area stimolata è visibilmente arrossata. Tamponare l'area sottostante all'elettrodo rosso (positivo) con una garza imbevuta in acqua distillata. Fare questo almeno tre volte e poi asciugare l'area con un panno.
22. Rimuovere la carta da filtro dal contenitore usando pinzette sterili e posizionarla sull'area stimolata.
23. Ricoprire immediatamente con parafilm o plastica e chiudere con nastro adesivo, facendo attenzione che il tutto sia ben adeso alla pelle. Evitare di toccare la parte interna del parafilm.
24. Rimettere i vestiti e lasciare il paziente per 30 minuti. Aumentare il tempo di raccolta a più di 30 minuti non aumenta il peso collezionato di una cifra significativa.
25. Strofinare la superficie del nastro adesivo per trasferire qualsiasi condensa di sudore sulla carta da filtro. Rimuovere dolcemente il nastro adesivo e usare pinzette sterili per trasferire la carta da filtro nel suo contenitore.
26. Chiudere bene il contenitore. Trasportare il contenitore in una busta di plastica. Ripesare usando la stessa bilancia a 4 decimali.

27. Stabilire l' idoneità dei campioni di sudore immediatamente dopo la raccolta. Calcolare il minimo peso accettabile di sudore, corrispondente a 1g/m<sup>2</sup>/min, come segue. (vedere linee guida 4.1.3), dove m<sup>2</sup>=area della superficie di raccolta.

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

Poi il tasso di sudore (g/m<sup>2</sup>/min) =

$$\frac{10000/\text{area (cm}^2) * \text{peso (mg o } \mu\text{l)/1000 * 1 (tempo di raccolta in minuti)}}{= (10 * \text{peso- mg o } \mu\text{l}) / (\text{area-cm}^2 * \text{tempo di raccolta - min}).}$$

Per esempio per un tempo di raccolta di 30 minuti su un diametro di carta da filtro di 5.5 cm  
1g/m<sup>2</sup>/min=71 mg.

Raccolte inferiori al minimo peso di sudore localmente stabilito, non dovrebbero essere analizzate. Il tempo di raccolta deve essere preso tenendo conto della valutazione di adeguatezza. Estendere il tempo di raccolta in modo da aumentare il campione, aumenta anche il peso minimo richiesto. Poiché la produzione di sudore cala velocemente dopo 30 minuti, una raccolta che è insufficiente a 30 minuti è molto probabilmente insufficiente anche a tempi maggiori di 30 minuti. Raccolte insufficienti di sudore non devono essere messe insieme per ottenere un volume sufficiente per l' analisi. L' intero test del sudore deve essere ripetuto.

28. Raccolte inferiori di 1g/m<sup>2</sup>/min non dovrebbero essere analizzate. Per relazionare il peso al tasso, usare la seguente formula:

raccolte insufficienti di sudore non devono essere messe insieme per ottenere un volume sufficiente per l' analisi. L' intero test del sudore deve essere ripetuto.

## **Analisi del sudore**

### **Principio:**

Il sudore prodotto viene eluito dalla carta da filtro in un diluente appropriato e analizzato per il cloro. Il cloro del sudore può essere analizzato tramite procedura colorimetrica, coulometrica o elettrodo selettivo per ioni.

### **Sostanze pericolose e natura del pericolo:**

sudore umano	<b>rischio biologico</b>
sostanze chimiche	<b>usare il metodo appropriato</b>

### **Precauzioni:**

evitare contaminazione o evaporazione del campione di sudore.

### **Requisiti del campione:**

procedere immediatamente all'analisi o conservare le raccolte su carta da filtro pesate del sudore a 4°, per un massimo di 3 giorni in contenitori di appropriate dimensioni a tenuta stagna che non permettano dispersione o evaporazione. Le raccolte di sudore possono essere trasportate per l'analisi a questa fase.

### **Strumenti e apparecchi:**

Appropriati alla metodologia. Vedere SOPs per analisi e manutenzione dell'attrezzatura.

### **Reagenti:**

Appropriati alla metodologia. Vedere SOPs.

### **Norme:**

Il metodo dovrebbe essere standardizzato usando materiali in commercio o casalinghi alle appropriate concentrazioni per i campioni di sudore, per esempio 0-150 mmol/L. la linearità e la sensibilità del metodo devono essere determinate per stabilire il loro range di lavoro. Il limite di rilevazione dovrebbe essere determinato per ogni analita misurato. Non dovrebbe essere superiore a 10 mmol/L.

### **Controllo di qualità interno:**

2 concentrazioni di materiale di controllo di qualità interno dovrebbero essere analizzate con ogni seduta di campioni del sudore. Una concentrazione dovrebbe rientrare nel range di normalità, e la seconda nel range intermedio o superiore alla normalità. Queste possono essere commerciali o casalinghe.

1. Usando pinzette riporre la carta da filtro in un contenitore etichettato. Azzerare la bilancia e registrare il peso di contenitore e carta da filtro fino a 4 decimali.

2. Pipettare il materiale di controllo di qualità interno nella carta da filtro fino ad ottenere approssimativamente lo stesso peso del campione del paziente.
3. Ripesare il contenitore e la carta da filtro a 4 decimali.
4. Trattare il campione del paziente e il materiale di controllo di qualità interno in parallelo per tutte le rimanenti fasi della procedura.

**Procedura:****Eluizione:**

1. Aggiungere l'eluente (il volume è metodo dipendente) alla carta da filtro del paziente e del IQC
2. Chiudere i contenitori ed eluire per un periodo da 1 a 3 ore. La miscelazione può essere raggiunta usando un mixer.
3. Centrifugare i contenitori per rimuovere qualsiasi fibra della carta da filtro. Usare il supernatante per l'analisi.

**Analisi:**

1. In doppio, quando possibile, preparare per l'analisi i campioni di sudore e il materiale per il controllo di qualità interna. Questo deve includere qualsiasi pre-diluizione del campione di sudore.
2. Analizzare il IQC e i campioni di sudore. Se qualche risultato fuoriesce dal range di lavoro del metodo, deve essere ripetuto ad una appropriata diluizione.

**Calcolo:**

Calcolare la concentrazione di cloro nell'IQC e nei campioni dei pazienti idonei per peso del sudore e per i fattori di diluizione. Tutti i calcoli devono essere controllati indipendentemente.

**Limiti accettabili per il controllo di qualità interno:**

I risultati dell'IQC dovrebbero rientrare nei limiti definiti a livello locale. I metodi devono essere in grado di produrre un  $cv > 5\%$  all'interno del lotto. Limiti accettabili per IQC devono riflettere questo.

**Referto**

Il referto dovrebbe includere:

- I. Identificazione completa del paziente
- II. Data e ora del test e data e ora della refertazione
- III. Risultati analitici (cloro) in mmol/L. deve essere esplicitato nel referto quale analita è stato misurato.
- IV. Intervalli di riferimento come descritto nella tabella nella sezione 6.1



- V. Interpretazione dei risultati, basati sui suddetti intervalli di riferimento e qualsiasi altra informazione inerente al paziente (per esempio sufficienza pancreatica, mutazioni CF atipiche, etc)

### **Bibliografia**

1. LE Gibson & RE Cooke A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilising pilocarpine by iontophoresis, *Pediatrics* 1959: 23; 545-549
2. Instruction Manual – sweat power supply
3. Medical Devices Agency. Safety Notice. MDA SN 1999 (05)
4. Guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of Cystic Fibrosis in the UK.

## Appendice 3

### Calcolo della media di sudore sul periodo di raccolta

La produzione media di sudore sull'area di campionatura è calcolata in g/m<sup>2</sup>/min per stabilire se la produzione di sudore è stata adeguata. L'area di campionatura è pari all'area ricoperta dal collettore di sudore, cioè dall'area della carta da filtro o del collettore Macroduct. Deve essere pari all'incirca all'area stimolata attraverso la pilocarpina per iontoforesi, cioè all'area ricoperta dal tampone imbevuto di pilocarpina o all'area del disco di pilogel.

Calcolare l'area di campionatura della carta da filtro in cm<sup>2</sup> come  $\pi r^2$  dove r è il raggio (i dischi di pilogel e l'area di campionatura del Macroduct hanno un diametro di 2.8 cm).

La media di sudore sul periodo di raccolta (g/m<sup>2</sup>/min) =  
 $10000/\text{area (cm}^2) * \text{peso (mg o ul)}/1000 * 1(\text{tempo di raccolta} - \text{min}) =$   
 $(10 * \text{peso} - \text{mg o ul})/(\text{area di raccolta} - \text{cm}^2 * \text{tempo di raccolta} - \text{min})$

Dovrebbe essere usato un volume o un peso minimo derivato di sudore. Questo deve dimostrarsi equivalente ad una media di 1 g/m<sup>2</sup>/min, per esempio per una raccolta di 30 minuti su una carta da filtro del diametro di 5.5 cm, 1g/m<sup>2</sup>/min = 71 mg.

Per una raccolta con Macroduct di 20 minuti, 1g/m<sup>2</sup>/min = 12 uL. Per una raccolta con Macroduct di 30 minuti, 1g/m<sup>2</sup>/min = 18 uL. La raccomandazione del produttore di 15 uL come volume minimo sembra essere la media di questi 2 valori. Questo enfatizza l'importanza del tempo di raccolta nell'interpretazione dell'intervallo minimo accettabile, e l'inutilità di incrementare il tempo di raccolta in modo da aumentare l'eventuale campione.