

COMMENTARY

诊断性汗液试验：囊肿性纤维化基金会指南

VICKY A. LEGRYS, DRA, JAMES R. YANKASKAS, MD, LYNNE M. QUITTELL, MD, BRUCE C. MARSHALL, MD,
AND PETER J. MOGAYZEL, JR, MD, HD

囊肿性纤维化基金会（CFF）对设在全国各地教学和社区医院内的，对囊肿性纤维化（CF）病人进行全面诊断和治疗的囊肿性纤维化中心，进行认证。CF中心由CFF中心委员会，按照覆盖临床、教学和研究的专门标准进行评估。汗液试验有特定的要求，要获得认证就要遵循这些要求。2006年CFF中心委员会向各CF中心的主任发去了汗液试验指南备忘录。[1]虽然这些指南是根据临床实验室标准学会（CLSI）——即过去的临床实验室标准全国委员会——的汗液试验文件C34-A2，和美国病理学家协会（CAP）认证计划的汗液试验检查单的项目制定的，但它们更多地是为了保持一致性而做的规定，着重于诊断试验，而非筛查试验。[2、3]这些指南可应用于各种年龄的，进行汗液氯化物试验的病人。

CFF中心必须遵从这些指南。对于任何进行诊断性CF试验的机构，这些要求也是适用的。虽然将汗液试验集中在CF中心内进行可能最为理想，但在实践中并没有这样做。根据全国汗液试验能力测试计划的记录，在2006年有600个以上的实验室进行了汗液试验。[4]随着新生儿CF筛查计划的广泛推行，CF的准确诊断就依赖于正确施行和正确解读汗液试验，这种依赖是至关重要的。筛查结果为阳性的所有婴儿，即使已经找出了两个引发CF的基因突变，也都要进行汗液氯化物测试。[5]

下面是2006年CFF汗液测试指南，以及对特定指南的述评。[1]

CF=囊肿性纤维化
CFF=囊肿性纤维化基金会
CLSI=临床实验室标准学会
CQI=连续质量改进
QNS=质量欠缺

指南和述评

指南1

实验室必须按照未修改的CLSI文件C34-A2所简要描述的步骤，进行定量匹鲁卡品离子电渗疗法汗液氯化物试验

述评 为诊断而进行的定量汗液测试包含四个步骤，它们在CLSI C34-A2中有详细描述：

- 用匹鲁卡品离子电渗法刺激汗液的产生。
- 用纱布、滤纸，或Macroduct 螺旋管(Wescor, Logan, UT)收集汗液。
- 评估收集的数量，以重量（毫克）或体积（微升）计算。
- 测量汗液氯化物浓度。这一过程在指南12 中描述。汗液电导的测量，例如，Sweat Chek 或 Nanoduct (Wescor, Logan. UT) 法不能用于诊断。

指南 2

实验室必须能读到上面提到的CLSI文件C34-A2——纸质文件或电子文件（www.clsi.org）均可。

述评 进行汗液收集和分析的人员，应熟悉CLSI文件的内容。

指南 3

离子电渗设备必须以电池为能源，并定期检查。

述评 为了安全，离子电渗电流须由电池产生。必须由生物医药工程人员按照制造商的建议，定期检查电流控制和漏电情况。

指南 4

测试所需的最小陈化期是48小时。

述评 汗液电解质在头24小时内可能短暂地增加。[6]如果在陈化48小时以后，可以获得合适的汗液试样，汗液测试就可以正确地进行。

指南 5

汗液收集部位只能是手臂上和腿。离子电渗电流不应流过心脏。

述评 从前臂或大腿上刺激产生和收集汗液。收集部位不能有炎症、皮疹和外伤，以避免样品被体液或血液污染。

指南 6

汗液必须在离子电渗后，收集在纱布或滤纸上，或收集在 Macroduct 螺旋管 (Wescor, Logan, UT)中。

a. 如果用纱布或滤纸收集，刺激区必须为2×2英寸（总面积4平方英寸）。用稍微小一点的电极（例如 1½ × 1½ 英寸）进行离子电渗。其它尺寸的电极，如果能覆盖50%以上的刺激区（即大于2平方英寸），也可以使用。离子电渗应该用USP级的匹鲁卡品进行5分钟。刺激以后，必须用 2×2英寸纱布或滤纸从一个部位收集汗液。用这种方法在30分钟内收集的汗样品至少为75毫克。

b. 如果使用 Macroduct 螺旋管收集汗液，就必须用一次性的，使用了 Webster 汗液诱导器 (Wescor, Logan, UT) 的 Pilogel 电极刺激5分钟。最小合格汗液量为15微升。

述评 为了获得正确的汗液测试结果，遵守从单一部位取得的最小重量或最小体积规定是至关重要的。对最小量的要求是为了确保合适的出汗速度和汗液电解质浓度。出汗速度小，汗液电解质浓度减小，样品蒸发的机会增大。为了确保结果正确，平均出汗速度应该超过每分钟 1g/m²。刺激和收集区面积必须相似，以正确地确定出汗速度，尽量减少蒸发或氯化物被非刺激汗液所稀释。

指南 7

汗液收集时间不能超过30分钟。

述评 如果汗液收集时间超过30分钟，为确保正确刺激所需的汗液总量就增加。延长收集时间，就增加了汗液蒸发的机会，而实际上并不能显著增加出汗量。

指南 8

如果大于3个月的婴儿的样本不足（即数量不够，或 QNS样本）发生率超过5%，必须进行调查并加以解决。

述评 如果遵循了CLSI 文件中的步骤和制造商的建议，那么3个月以上婴儿的QNS率低于5%就不成为一个问题。影响汗液收集的因素包括年龄、体重、种族、皮肤状况和收集系统。例如，小于2000克，不到38周的婴儿，或非裔美国人婴儿有较大可能不能产生足够大的样本。[7]有报告说，与纱布收集法比较，Macroduct 螺旋管法的失败率较大。[8]QNS率的计算依据是未能获得合适的汗液样本的试验所占的百分比。如果进行双侧（双重）汗液收集，那么从任何一侧都不能获得汗液样本，才被认为是QNS。例如，在一个进行双侧试验的机构中，一个病人开始时两侧都不能产生合适的样本（100% QNS）。一周以后他回来了，一侧能够产生合适的样本，另一侧不能产生合适的样本（0% QNS）。这时总的QNS 率为50%。

指南 9

建议进行双重收集和分析。

述评 建议进行双重收集和分析。但不需要将它作为一种质量保障机制。要注意，同一天进行的双重试验不能当做独立的重复试验。

指南 10

不足的样本不要分析，也不能和其他样本拼合起来进行分析。

述评 因为关于最小样本体积或重量的要求是出于生理学方面，而非分析方面的原因，所以每个汗液样本都须独立地超过每分钟 $1\text{g}/\text{m}^2$ 的出汗速度。拼合或分析数量不足的样本可能产生假阳性或假阴性汗液试验结果，对病人的诊断治疗会产生重大的影响。

指南 11

汗液收集和分析步骤必须设计得能使蒸发量和/或污染降低到最小。其专门技术请参阅CLSI文件C34-A2的8.1.3.1和8.1.4节。

述评 收集在纱布内的汗液被称量后，可以储存在紧紧密封的容器内，加或不加稀释液均可，在冷藏温度下储存时间最多为3天。[9]关于储存在Macroduct螺旋管中的汗液的研究没有公布，因此实验室要对储存条件进行验证。

指南 12

必须用下列方法之一对汗液进行定量分析，测定氯化物含量：

- a. 电量滴定法测定氯化物——使用氯量计；
- b. 手动滴定法测定氯化物——使用 Schales 和 Schales 硝酸汞法；
- c. 自动分析仪测定氯化物——使用已经和上述方法a或b进行过比较，系统地验证了其有效性的离子选择性电极。

需要在病人样本中添加外来氯化物，以提高分析灵敏度的分析方法不应采用。

述评 设计用来量化血清氯化物的自动分析仪可能缺乏汗液分析所需要的灵敏度，因此在使用前必须用含有低浓度氯化物（例如 10 mmol/L）的试样验证其有效性。要注意，使用离子选择性电极作为氯化物电极的自动分析仪不同于贴在病人皮肤上，现场读数或直接读数的氯化物电极。

指南 13

按照1998年临床实验室改进法案（CLIA,1998），每次汗液分析，都使用两种浓度的对照物，进行并评估质量管理。[10,11]

述评 每次病人测定，都要分析一个阳性和阴性对照物。如果汗液收集在纱布或滤纸上，对照物就直接加到收集表面上，并被洗脱，用于分析。

指南 14

建议将汗液试验纳入实验室的总体CQI（连续质量改进）评估内容。

述评 CQI 评估应包括每年的QNS样本、不确定结果和阳性结，以及皮肤副反应的百分率。这些变量应由CF中心主任和实验室主任复查。

指南 15

在整个汗液收集过程中，汗液样本必须附有适当标签，用于识别病人。试剂也必须附有适当标签。

指南 16

必须使用合适的汗液氯化物参考值：<40 mmol/L=阴性； 40 - 60 mmol/L=不确定；>60 mmol/L=和CF诊断一致。

注意：文件记载过：在基因诊断的CF病人中，也有汗液氯化物< 40 mmol/L 的。临床相关性是必需的。[12]

述评 在婴儿中进行的汗液试验结果表明，汗液氯化物大于 30 mmol/L，应被视为不正常，需要进行进一步评估。[5,13-17]

指南 17

检测下限应由实验室确定，应该是10 mmol/L。须报告的最高值不应大于160 mmol/L。

述评 分析方法应能在平均正常浓度时（约 10 mmol/L）准确地测量汗液氯化物。[18] 低于检测下限的汗液浓度应该报告为“小于”。例如“<10 mmol/L”。虽然分析仪器的测量范围可能达到160mmol/L，但高于此的浓度在生理学上是不可能的，因此不应当报告。[19]如果病人的汗液氯化物高于160mmol/L，就要重试，因为这可能缘于污染或技术差错。

指南 18

在CAP的汗液试验分析熟练程度测试调查中，所有实验室必须将成功的表现记入文件。

述评 在汗液试验熟练程度测试计划中，CAP准备了三份试样，邮寄给实验室，每年两次。他们在相对于分析组中其他成员的表现情况也反馈给实验室。[20]

指南 19

我们强烈地建议，中心主任应用1996年“健康保险可移植性和可归责性法”（HIPAA）规则，复查所有汗液试验结果。

述评 中心主任对汗液试验结果的复查可以提供改进中心内CF诊断质量的机会。还有，在“非典型”CF评估期间，还可以为汗液试验的解读带来额外的专家意见。这是特别重要的，因为国家正在着手进行新生儿筛查，每个极幼婴儿都在做汗液试验。

指南 20

所有阳性结果都必须用不同时间进行的一次重复的汗液氯化物试验，或用其它CF诊断方法加以证实。

述评 为了进行诊断，汗液氯化物试验结果为阳性时，必须在其他时间进行一次重复试验加以证实；或用识别出两个“囊肿性纤维化经膜电导调节器基因”（CFTR）突变——已知它们能够引起CF——的方法，或根据异常的新生儿上皮细胞电生理研究结果，加以证实。[12]所有结果不确定的试验都要重新进行。建议：如在新生儿筛查中识别出来的病人，其汗液试验结果不确定时，重复试验要在1-2个月内进行。[5]如果重复试验结果仍是不确定的，辅助试验，如基因分型、胰腺功能评估、呼吸道微生物学和泌尿生殖器评估等可能有所助益。[12]对于汗液试验结果不确定的病人，要监测其呼吸问题和营养状况。[5]对于临床进程不像所预期的那样的确诊CF病人，也要重复进行汗液试验。[2]

CFTR突变分析可以用于证实不正常的汗液试验结果。但是，由于许多突变不是用典型的，用于CF筛查的mutation panels 法检测的，所以为了证实诊断，还需要重复进行汗液氯化物试验。

指南 21

汗液试验必须每周能进行两次，排队等候时间应少于两周。

评述 汗液试验无需久等，这对于及时诊断和减轻家长在等候期间的焦虑，是至关重要的。

指南22

汗液试验必须由数量有限，有经验，受过良好训练，通过定期的有记录可查的资格测试的人员，对数量足够的病人进行。CLIA 1988 要求新来人员在第一年每6个月，以后每年进行一次资格测试。[10,11]

述评 病人的误诊被归因于实验室进行的试验太少，不足以维持熟练程度。[21,22]但是，何为汗液试验的“足够次数”是主观决定的，不易定量化。在CFF不规定需进行的最少汗液试验次数时，它已经允许每个实验室确定其为保持熟练程度所需进行的试验次数。关于QNS比率要受到监测的要求，以及关于中心主任要参与复查汗液试验结果的要求，可保证实验室有能力进行这些试验。

指南 23

不宜使用下列方法进行汗液试验：

- a. 直接应用氯化物电极于病人皮肤。
- b. 将一块皮肤贴直接贴在病人皮肤上的氯化物沉淀反应。
- c. 仅仅测量钾和钠。
- d. 同渗重摩法。
- e. 电导法，包括汗液 Chek 或 Nanoduct (Wescor, Logan, UT)法。
- f. 任何其它筛查（非定量）试验。

述评. 上述方法不宜用于在CF中心进行诊断。但CFF批准了，在社区医院这样的门诊场所可以将Wescor Macroduct Sweat-Chek 电导分析仪用于筛查，使用的判定标准是：**如果一个人的汗液电导 $\geq 50\text{mmol/L}$ ，就应被认证为可以进行定量汗液氯化物试验（CF医疗中心）。**

结论

尽管有基因试验法，但定量的匹鲁卡品离子电渗汗液氯化物试验仍然是CF诊断的黄金标准。因此，对于CF中心的运行来说，正确地进行汗液试验是极端重要的。特别是当新生儿CF筛查越来越普及的时候，更是如此。

参考文献

1. Cystic Fibrosis Foundation Center Committee. Sweat Testing Standards Memorandum, December 2006, Bethesda, Maryland.
2. Clinical Laboratory Standards Institute formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Analysis: Approved Guideline. NCCLS Document C34-A2. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
3. College of American Pathologists. Chemistry Checklist, Laboratory Accreditation

Program, Chicago, IL, http://www.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/checklists/chemistry_and_toxicology_april2006.pdf.

4. College of American Pathologists. Participant Summary Report, SWA-2006, Chicago IL.

5. Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell PW III, Hoffman G, Parad RB, et al. Guidelines for implementation of cystic fibrosis: newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation Workshop Report. *Pediatrics* 2007;119:495-518.

6. Hardy JD, Davison SH, Higgins MU, Polycarpou PN. Sweat tests in the newborn period. *Arch Dis Child* 1973;48:316-8.

7. Eng W, LeGrys VA, Schechter M, Laughton M, Parker PM. Sweat testing in preterm and full term infants less than 6 weeks of age. *Pediatr Pulmonol* 2005;40:64-67.

8. Hammond KB, Turcios NL, Gibson LE. Clinical evaluation of the Macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis.

J Pediatr 1994;124:255-60.

9. LeGrys VA. Stability of chloride in sweat testing. *Clin Lab Sci* 1993;6:156-7.

10. Department of Health and Human Services, Centers for Medicare and Medicaid Services. Clinical laboratory improvement amendments of 1988: final rule. *Fed Register* 2003;7165:[42CFR493.1255].

11. Department of Health and Human Services, Centers for Medicare and Medicaid Services Center for Disease Control and Prevention. Medicare, Medicaid and CLIA Programs: Laboratory Requirements Relating to Quality Systems and Certain Personnel Qualifications: final rule. *Fed Register* 2003;68:16[42CFR493].

12. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus state- ment. *J Pediatr* 1998;132:589-95.

13. Parad RB, Comeau AM, Dorkin H, Dovey M, Gerstle R, Martin T, Sullivan BP. Sweat testing infants detected by cystic fibrosis newborn screening. *J Pediatr* 2005;147:S69-72.

14. Rock MJ, Hoffman G, Laessig RH, Kopsih GJ, Litsheim TJ, Farrell PM.

Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: nine year experience with routine trypsinogen/DNA testing. *J Pediatr* 2005;147:S73-7.

15. Sontag MK, Hammond KB, Zielenski J, Wagener JS, Accurso FJ. Two tiered immunoreactive trypsinogen based newborn screening for cystic fibrosis in Colorado: screening efficacy and diagnostic outcomes. *J Pediatr* 2005;147:S83-8.

16. Taccetti G, Festini F, Braccini G, Campana S, deMartino M. Sweat testing in newborns positive to neonatal screening for cystic fibrosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2004;89:F463-4.

17. Massie J, Chements B. 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;39:440-6.

18. Farrell PM, Koscik RE. Sweat chloride concentrations in infants homozygous or

heterozygous for F508 cystic fibrosis. *Pediatrics* 1996;97:524-8.

19. Schulz IJ. Micropuncture studies of the sweat formation in cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 1969;48:1470-7.

20. LeGrys VA. Assessment of sweat testing practices for the diagnosis of cystic fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:1420-4.

21. Rosenstein BJ, Langbaum TS. Misdiagnosis of cystic fibrosis: need for continuing follow-up and reevaluation. *Clin Pediatr* 1987;26:78-82.

22. Tocci PM, McKey RM. Laboratory confirmation of cystic fibrosis. *Clin Chem* 1976;22:1841-4.

23. CF Center Directors Update No. 1. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation, 1990.