



Determinación cuantitativa de cloro en el sudor: Evaluación y comparación de dos métodos analíticos

*Quantitative determination of chlorine in sweat.
 Evaluation and comparison of two analytical methods*

Salas Carolina,* Navea Daniel,* Lobos Germán[‡]

Palabra clave:

Fibrosis quística, test del sudor, Gibson y Cooke.

Keywords:

Cystic fibrosis, sweat test, Gibson and Cooke.

* Unidad de Laboratorios Clínicos, Hospital «Dr. Luis Calvo Mackenna». Providencia, Santiago de Chile.

[‡] Programa de Investigación de Excelencia Interdisciplinaria en Envejecimiento Saludable (PIEI-ES), Universidad de Talca. Talca, Chile.

Correspondencia:
Carolina Salas Palma
 Jefe de Laboratorios Clínicos, Hospital «Dr. Luis Calvo Mackenna». Av. Antonio Varas Núm. 360, Santiago, Providencia, Chile.
 Teléfono: +56 2 25756293
 E-mail: csalas@calvomackenna.cl

Recibido:
 15/11/2019

Aceptado:
 02/12/2019

RESUMEN

Introducción: En 99% de los pacientes diagnosticados con fibrosis quística se presenta una alteración en la concentración de cloro en el sudor (mayor a 60 mEq/L), por lo cual el test del sudor es el examen de confirmación para esta enfermedad. De ahí, la necesidad de que el laboratorio disponga de técnicas validadas como metodología de referencia. **Objetivo:** Se realizó una verificación analítica del equipo Sherwood Chloride Analyzer 926[®] para la medición de cloro en el sudor, recolectado por la técnica de Gibson y Cooke. **Material y métodos:** Estudio prospectivo, realizado entre mayo y agosto de 2015. Se analizaron 441 muestras de sudor en equipos Labconco[®] (referencia) y Chloride Analyzer 926[®] (prueba). Para el análisis de los valores cuantitativos, se utilizó el coeficiente de correlación intraclass y de concordancia de Lin; para los cualitativos, se utilizó el índice Kappa y el área bajo la curva de rendimiento diagnóstico. **Resultados:** Se obtuvo un grado de acuerdo con ambas medidas con valores de coeficiente de correlación intraclass = 0.9936 y coeficiente de correlación de concordancia = 0.9672 para un intervalo de confianza del 95%. **Conclusiones:** El equipo Sherwood Chloride Analyzer 926[®] tiene un comportamiento analíticamente similar al de referencia.

ABSTRACT

Introduction: In 99% of patients diagnosed with cystic fibrosis have an alteration in the concentration of chlorine in sweat (greater than 60 mEq/L), so the sweat test is the disease confirmation test. Hence the need that the laboratory has validated techniques reference methodology. **Objective:** Analytical verification of the Sherwood Chloride Analyzer 926[®] equipment for measuring chlorine in sweat, collected by the Gibson and Cooke technique. **Material and methods:** Prospective study conducted between May and August 2015 441 sweat samples were analyzed in Labconco[®] (reference) and Sherwood Chloride Analyzer 926[®] (test) equipment. For the analysis of quantitative values, intraclass correlation coefficient and Lin concordance were used, for the qualitative Kappa index and area under the diagnostic performance curve was used. **Results:** A degree of agreement was obtained for both measures with intraclass correlation coefficient values = 0.9936 and concordance correlation coefficient = 0.9672 for a 95% confidence interval. **Conclusions:** The Sherwood Chloride Analyzer 926[®] has an analytically similar behavior to the reference.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad de herencia mendeliana autosómica recesiva, es decir, que se presenta cuando ambos padres de un niño con esta enfermedad son portadores, su recurrencia tiene un riesgo de 25% por cada gestación y cada hijo sano tiene 2/3 de probabilidades de ser portador.¹ Asimismo, constituye la enfermedad hereditaria

letal más frecuente en la raza caucásica, con una incidencia de 1:3,200 recién nacidos en Estados Unidos.²

La presencia de dos mutaciones en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR) confirma el diagnóstico, sin embargo, éste no puede ser descartado en aquellos pacientes con ninguna o solo una mutación identificada.³

Considerando que en más de 99% de los pacientes con FQ se tienen valores elevados en las concentraciones de sodio (Na) y cloro (Cl) en muestras de sudor (mayores a 60 mEq/L), el resultado del test del sudor se considera como confirmatorio.

Se han descrito una serie de técnicas de recolección de sudor.⁴ Sin embargo, en Chile, tal como se realiza en otros países,⁵ la técnica de referencia sigue siendo la técnica de Gibson y Cooke,⁶ la cual consiste en la recolección de sudor por iontoforesis. Posterior a esta recolección, se realiza el análisis propiamente, que consiste en la determinación cuantitativa de Cl utilizando coulometría.⁷ Clínicamente, por una parte, una concentración de cloruro menor a 30 mEq/L descarta la presencia de la enfermedad, pero concentraciones entre 30 a 59 mEq/L son indicadores de un diagnóstico dudoso, por lo que se sugiere una repetición del examen. Por la otra, valores mayores a 60 mEq/L son suficientes para establecer el diagnóstico de FQ.⁸

En Chile, el Ministerio de Salud es el organismo que define los centros de referencia de la red asistencial pública para el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías. En el año 2003, designó al Hospital «Dr. Luis Calvo Mackenna» (HLCM) como uno de los centros de referencia para FQ. A partir de ese año, el Laboratorio Clínico del mismo hospital se estableció como uno de los centros a nivel país en donde se comenzó a realizar el examen confirmatorio de test del sudor, utilizando para ello el clorhidrómetro Labconco® (equipo referencia) para la determinación cuantitativa del Cl en el sudor, el cual es realizado por coulometría.

Lamentablemente, este equipo fue discontinuado, por lo que fue imposible contar con la reposición de piezas, así como el abastecimiento de reactivos necesarios para su funcionamiento. Es por eso que el objetivo del presente estudio fue evaluar y comparar analíticamente un nuevo equipo (prueba): Sherwood Chloride Analyzer 926®, para la medición de Cl en el sudor recolectado mediante iontoforesis y, de este modo, se pueda dar continuidad al diagnóstico de FQ, utilizando para ello la metodología de referencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de investigación y selección de la muestra

Se trata de un estudio prospectivo llevado a cabo de mayo a agosto de 2015. El análisis de las muestras de sudor se realizó en el Laboratorio Clínico del Hospital «Dr. Luis Calvo Mackenna» (HLCM). En él se incluyeron todas las muestras obtenidas durante el periodo de estudio, cuyo peso de sudor obtenido se encontrara entre los 100 y 200 mg. Se excluyeron todas aquellas muestras con pesos

de sudor menor a 100 mg y mayor a 200 mg. No hubo reclutamiento de pacientes para este estudio, puesto que se trataba de muestras de pacientes que se encontraban en control o diagnóstico de FQ.

Recolección de las muestras

La toma de muestra de sudor fue realizada por personal de laboratorio debidamente entrenado y capacitado.⁹ El método de recolección de sudor utilizado fue el método de Gibson y Cooke, el cual consiste en la recolección de sudor en papel filtro, luego de la estimulación de la secreción sudoral por iontoforesis con pilocarpina. Posterior a la obtención de la muestra de sudor, ésta se diluyó con 15 mL de agua bidestilada y se dejó reposar al menos por 24 horas a temperatura ambiente antes de realizar la medición de Cl. Las muestras en estas condiciones son estables hasta por cinco días a temperatura ambiente.

La obtención de la muestra indicada anteriormente se utilizó para realizar las mediciones en ambos equipos en paralelo.

Selección de equipo de prueba

Se seleccionó el equipo Sherwood Chloride Analyzer 926® debido a que las condiciones de la muestra eran similares que el equipo de referencia. Asimismo, ambos equipos (referencia y de prueba) utilizan como metodología analítica la titulación coulométrica.

Análisis cuantitativo del Cl por medio del equipo Labconco® y de Sherwood Chloride Analyzer 926® por coulometría

El equipo de referencia Labconco® de manera rutinaria es manejado utilizando los controles comerciales Sweat control (EliTech Group®) en tres niveles: 22, 50 y 100 mEq/L, cuyos coeficientes de variación son de 4.6, 2.0 y 1.0 respectivamente. Además, se utilizó el programa Sweat Analysis como control de calidad externo por el Colegio Americano de Patólogos (CAP). Tanto el análisis como validación de resultados fue realizado por profesionales capacitados y debidamente acreditados según la normativa nacional para desempeñarse en laboratorio clínico.

Se estableció al equipo Labconco® como referencia y al equipo Sherwood Chloride Analyzer 926® como equipo de prueba. La medición de Cl de cada muestra se realizó en equipo de referencia y equipo de prueba.

Los análisis de medición de Cl en cada equipo se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante para cada uno de ellos.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS 22.0® y MedCalc v.15.8. Una concentración de Cl menor a 30 mEq/L sirvió para descartar la presencia de la enfermedad ($X = 0$) y una concentración entre 30 a 59 mEq/L fue indicador de un diagnóstico dudoso ($X = 1$); en dado caso, se sugirió una repetición del examen, en tanto valores mayores a 60 mEq/L fueron suficientes para establecer el diagnóstico de FQ ($X = 2$).⁸ Valores de Cl mayores a 160 mEq/L no se consideraron fisiológicamente posibles, más bien se consideraron como indicadores de errores en la recolección de la muestra.² Para un análisis multinomial, se consideraron los resultados que descartan la enfermedad ($X = 0$), que son dudosos ($X = 1$) y que confirman la presencia de la enfermedad ($X = 2$).

Sin embargo, dado que el resultado de interés es «ausencia/presencia» de FQ, las variables fueron recodificadas; además, en una variable cualitativa binomial como un valor menor a 60 mEq/L, se descartó la presencia de la enfermedad ($X = 0$) y en valores mayores a 60 mEq/L implicó establecer el diagnóstico de FQ ($X = 1$).

Para la concordancia entre los valores obtenidos en el equipo de referencia en comparación con el de prueba, se utilizó el coeficiente de correlación-concordancia (ρ_c) de Lin.¹⁰ Se calculó también el índice ponderado de Kappa de Cohen¹¹ para medir la concordancia de las variables cualitativas, el cual ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada. Utilizando las tablas de contingencia, se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), además se utilizó la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para calcular la exactitud.

RESULTADOS

En este estudio se incluyó un total de 441 muestras de sudor ($n = 441$), obtenidas de individuos independientes entre sí y recolectadas durante el periodo de estudio (Tabla 1). A cada muestra se le determinó la concentración de

Tabla 1: Clasificación de muestras incluidas en estudio de acuerdo con la concentración de Cl ($n = 441$).

Concentración de Cl	n (%)
< 29 mEq/L	411 (93)
30-59 mEq/L	13 (3)
> 60 mEq/L	17 (4)

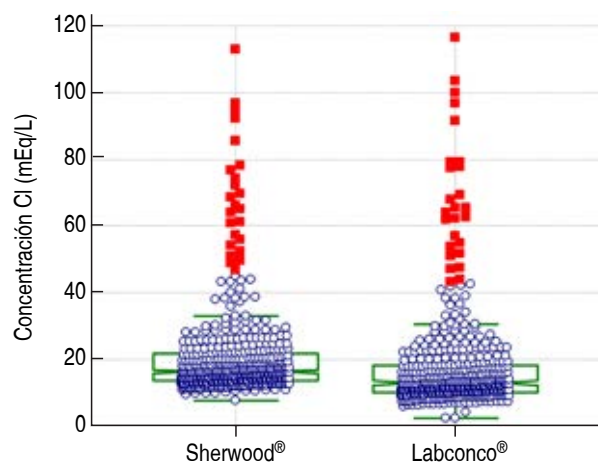


Figura 1: Dispersión de los datos.

Cl de manera paralela en ambos equipos (referencia y prueba). Se recolectaron muestras de sudor de pacientes menores de 15 años. El peso promedio de sudor obtenido fue de 132 ± 16 mg. El valor promedio de Cl fue de 17.8 ± 15.1 mEq/L para equipo Labconco® y de 20.8 ± 13.8 mEq/L para equipo Sherwood Chloride Analyzer 926®.

Análisis de datos

La prueba W de Shapiro-Wilk¹² permitió rechazar la normalidad de los datos del equipo Labconco® ($W = 0.6123$, $p < 0.0001$) y de Sherwood Chloride Analyzer 926® ($W = 0.613$, $p < 0.0001$). La distribución de los valores se puede observar gráficamente en las Figuras 1 y 2, donde existe una alta concentración de los datos para los valores menores a 40 mEq/L.

Según la prueba C de Cochran,¹³ no se observaron valores anómalos ($C_{\text{calc.}} = 0.11 < C_{\text{crít.}}, \alpha = 2.5\% = 0.50$) (Figura 1).

Existe un error sistemático del equipo

El equipo Sherwood Chloride Analyzer 926® respecto al equipo Labconco® en nuestro análisis correspondió a -1.8. La línea de regresión de las diferencias muestra que la diferencia entre ambos métodos es lineal a lo largo del rango de medición. Esto significa que el error sistemático es proporcional (Figura 2).

Se realizó un análisis de correlación entre los valores de Cl obtenidos por cada equipo, obteniéndose un grado de acuerdo absoluto de ambas medidas ($CCI = 0.9936$). Además, se obtuvo $\rho = 0.9918$ (precisión) y $C_b = 0.9756$ (exactitud), por lo que ρ_c fue $= 0.9672$ (Tabla

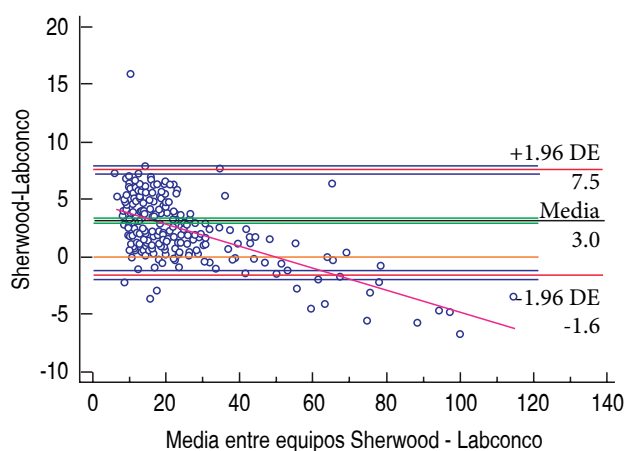


Figura 2: Gráfico de Bland y Altman y error sistemático.

2). Para el análisis cualitativo de los resultados, se realizó un análisis multinomial (ausencia de la enfermedad, diagnóstico dudoso o diagnóstico de FQ) y se obtuvo una concordancia global observada de 99.55%, con un índice Kappa (IC) = 0.965 (DE = 0.024) e índice ponderado Kappa = 0.977 (DE = 0.016) (Tabla 3). Finalmente se realizó análisis binomial (ausencia de la enfermedad y diagnóstico de FQ), obteniéndose una concordancia global observada de 99.77%, con un índice Kappa (IC) = 0.969 (Tabla 4).

El valor predictivo positivo (VPP) se estimó en 100% (Tabla 5), mientras que el valor predictivo negativo (VPN) se estimó en 99.76%. La sensibilidad (S) o probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo (FVP) fue de 99.12%. La especificidad (E) o probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano (FVN) fue de 100%. El área bajo la curva ROC fue 97.10% ($p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Las recomendaciones y guías internacionales sugieren el uso de la iontoforesis como la técnica de recolección del sudor y posterior titulación del Cl por coulometría.³ A pesar de ello, existen una serie de metodologías para la determinación de Cl, tales como colorimetría y métodos de electrodo-ion selectivo (ISE).⁷ Para nosotros fue muy importante poder realizar una verificación del nuevo equipo sin introducir cambios a la toma de muestra de sudor; por este motivo, la comparación de ambos equipos se realizó de manera paralela utilizando en forma consecutiva la misma muestra. También era importante dar continuidad al examen utilizando la misma metodología de medición de Cl que, en este caso, es la titulación coulométrica.

Tabla 2: Coeficiente de correlación-concordancia de Lin (n = 441).

Variable Y	Labconco® (referencia)
Variable X	Sherwood® (prueba)
Tamaño de la muestra	441
Coeficiente de correlación intraclass (CCI)	0.9936
Intervalo de confianza al 95%	(0.9936 - 0.9947)
Correlación de Pearson (p)	0.9918
Factor de corrección de sesgo (C_b)	0.9756
Coeficiente de correlación-concordancia de Lin (P_c)	0.9672
Intervalo de confianza al 95%	(0.962 - 0.9718)

En relación con las variables cuantitativas se puede ver que existe una muy buena concordancia entre los resultados conseguidos por ambos equipos, obteniendo un coeficiente de correlación intraclass de 0.9936, lo cual demuestra una correlación excelente. Además, fue posible obtener una precisión demostrada a través del además un coeficiente de Pearson (p 0.9918) y la exactitud mediante el coeficiente de correlación (concordancia p_c de 0.9672).

Al realizar el análisis en relación a las variables cualitativas, se puede observar una concordancia casi perfecta para ambas comparaciones, cuyos resultados resultaron ser de 99.6 y 99.8%, en caso de considerar los tres intervalos probables (multinomial) y presencia o ausencia de la enfermedad (binomial), respectivamente.

Otro de los análisis cualitativos que se realizaron fue conocer el valor predictivo del resultado del examen obtenido por el equipo de prueba en relación con el de referencia. La probabilidad de tener la enfermedad si el resultado del examen es positivo (VPP = 100%) y la probabilidad de no tener la enfermedad si el resultado del examen es negativo (VPN = 99.8%); la sensibilidad (FVP = 99.1%), y la especificidad (FVN = 100%) sugieren una alta capacidad predictiva. Según el área bajo la curva ROC, la capacidad predictiva de ambas medidas es buena.

Encontramos diferencias en los resultados de Cl solo en un caso, el cual presentó un valor de 61.85 (equipo de referencia) y de 57.26 (equipo de prueba); claramente estos valores estaban muy cerca del valor de corte, por lo cual la diferencia observada hizo clasificar los resultados de manera diferente. Sin embargo, analíticamente hablando, los valores están dentro de los límites aceptables.

Tabla 3: Clasificación resultados de equipos, proporción de aciertos y errores: multinomial.

		Equipo Sherwood® (prueba)			Total	%
		Y = 0	Y = 1	Y = 2		
Equipo Labconco® (referencia)	X = 0	410	1	0	411	93.2
	X = 1	0	13	0	13	2.9
	X = 2	0	1	16	17	3.9
Total		410	15	16	441	100.0
%		93.0	3.4	3.6	100.0	
Número de aciertos			441			
Concordancia global (%)			99.55			
Índice de kappa (K)			0.965 DE = 0.024 (0.918-1.000)			
Índice ponderado kappa (Kc)			0.977 DE = 0.016 (0.946-0.925)			

Tabla 4: Clasificación resultados de equipos, proporción de aciertos y errores: binomial.

		Equipo Sherwood® (prueba)		Total	%
		Y = 0	Y = 1		
Equipo Labconco® (referencia)	X = 0	424	0	424	96.1
	X = 1	1	16	17	3.9
Total		425	16	441	100
%		96.4	3.6	100.0	
Número de aciertos			440		
Concordancia global (%)			99.77		
Índice de kappa (K)			0.969 DE = 0.031 (0.907-1.000)		
Índice ponderado kappa (Kc)			0.969 DE = 0.031 (0.907-1.000)		

Tabla 5: Clasificación resultados de equipos, proporción de aciertos y errores (n = 441).

		Equipo Labconco® (diagnóstico de referencia)	
		Y = 0 (negativo)	Y = 1 (positivo)
Equipo Sherwood® (prueba diagnóstica)	X = 1 (positivo)	FP = 0	VP = 16
	X = 0 (negativo)	VN = 424	FN = 1
VPP (valor predictivo positivo) (%)		100.0	
VPN (valor predictivo negativo) (%)		99.76	
Sensibilidad, FVP (%)		99.12	
Especificidad, FVN (%)		100.0	
Área bajo la curva ROC			
%		84.6	
DE		0.033	
IC		(0.905, 1.036)	

En un estudio anterior se probó el equipo Sherwood Chloride Analyzer 926®, pero obteniendo la muestra con otro sistema de colección de sudor. En ambos casos, los resultados fueron similares, lo cual reafirma nuestros resultados.¹⁴

Nuestro estudio correspondió a un estudio de verificación analítico, sin considerar la demografía de los pacientes de los cuales se obtuvo la muestra; no obstante, se cumplió el objetivo de dar continuidad al diagnóstico de FQ utilizando un nuevo equipo Sherwood Chloride Analyzer 926®, que ha sido verificado con el equipamiento de referencia.

CONCLUSIÓN

De acuerdo con estos resultados, se concluye que se puede remplazar el equipo Sherwood Chloride Analyzer 926® (prueba) por el equipo Labconco® (referencia) para la realización del examen de test del sudor, usando la metodología de referencia de coulometría y sin alterar la toma de muestra de sudor (etapa preanalítica), la cual está estandarizada por la metodología de Gibson y Cooke.

REFERENCIAS

1. Sánchez I, Pérez A, Boza L, Lezana V, Vila MA, Repetto G et al. Consenso nacional de fibrosis quística. *Rev Chil Pediatr.* 2001; 72 (4): 356-380.
2. Farrell P, White T, Ren C, Hempstead S, Accurso F, Derichs N et al. Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. *J Pediatr.* 2017; 181: S4-S15. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.09.064.
3. Massie J, Greaves R, Metz M, Wiley V, Graham P, Shepherd S et al. Australasian Guideline (2nd ed.): An annex to the CLSI and UK guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Biochem Rev.* 2017; 38 (3): 115-130.
4. Gokdemir Y, Vatansever P, Karadag B, Seyrek T, Baykan O, Bas Ikizoglu N et al. Performance evaluation of a new coulometric endpoint method in sweat testing and its comparison with classic Gibson & Cooke and chloridometer methods in cystic fibrosis. *Front Pediatr.* 2018; 6: 133. doi: 10.3389/fped.2018.00133.
5. Vermeulen F, Lebecque P, De Boeck K, Leal T. Biological variability of the sweat chloride in diagnostic sweat tests: a retrospective analysis. *J Cyst Fibros.* 2017; 16 (1): 30-35. doi: 10.1016/j.jcf.2016.11.008.
6. Gibson L, Cooke R. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* 1959; 23 (3): 545-549.
7. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev.* 2005; 26 (4): 135-153.
8. Grupo Técnico, Programa de Fibrosis Quística, Unidad de Salud Respiratoria, Subsecretaría de Redes Asistenciales. Ministerio de Salud del Gobierno de Chile. Guía Técnica "Programa Nacional de Fibrosis Quística Orientaciones Técnicas Programáticas para Diagnóstico y Tratamiento" 2012.
9. LeGrys V, Applequist R, Briscoe D, Farrell P, Hickstein R, Lo S et al. Sweat testing: sample collection and quantitative chloride analysis; Approved Guideline. 3rd edition. CLSI document C34-A3: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
10. Lin L. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics.* 1989; 45 (1): 255-268.
11. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement.* 1960; 20 (1): 37-46.
12. Shapiro S, Wilk M. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika.* 1965; 52 (3-4): 591-611.
13. Cochran W. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Annals of Human Genetics.* 1941; 11 (1): 47-52.
14. Emiralioglu N, Özçelik U, Yalçın E, Doğru D, Kiper N. Diagnosis of cystic fibrosis with chloride meter (Sherwood M926S chloride analyzer®) and sweat test analysis system (CFA collection system®) compared to the Gibson Cooke method. *Turk J Pediatr.* 2016; 58 (1): 27-33.