

Como Interpretar as Provas de Suor com Valores *Borderline* no Diagnóstico de Fibrose Quística

CELESTE BARRETO, LUISA PEREIRA

Centro Especializado de Fibrose Quística
Clínica Universitária Pediátrica do Hospital de Santa Maria

Resumo

O objectivo deste artigo é chamar a atenção para o problema da confirmação diagnóstica de Fibrose Quística (FQ) nos casos com valores *borderline* na Prova de Suor e com apresentações ditas "não clássicas". Muitas destas situações são consequência de metodologias inadequadas na execução da Prova de Suor e de valores de referência incorretos.¹

No Centro Especializado de Fibrose Quística (CEFQ), da Clínica Universitária Pediátrica do Hospital de Santa Maria (HSM), foram excluídos, nos últimos 15 anos, 54 doentes referenciados com hipótese diagnóstica de FQ, por provas de suor *borderline* e sintomatologia possível de FQ. Com base na experiência dos casos clínicos excluídos e com recurso a novos métodos diagnósticos, preconiza-se protocolo para confirmação diagnóstica de FQ, no nosso Centro.

Palavras-Chave: fibrose quística, prova de suor, valores *borderline* de cloreto, valores de referência, diagnóstico, apresentações "não clássicas".

Summary

How to Interpret Sweat Tests with *Borderline* Values for the Diagnosis of Cystic Fibrosis

This article aims at directing attention to the problem of confirming Cystic Fibrosis (CF) diagnosis in cases with *borderline* values in sweat test and when cases considered "non-classic" occur.

Many of the situations originate from inadequate methodologies on performing the sweat test and from incorrect reference values¹.

In the last 15 years, at the Centro Especializado de Fibrose Quística (CEFQ) of the Clínica Universitária Pediátrica, Hospital Santa Maria (HSM), 54 patients who had been diagnosed with a hypothetical CF, through *borderline* sweat tests and possible CF symptoms were excluded as they didn't present the disorder

Based on the experience of the excluded clinical cases and by applying new diagnosis methods, a protocol for confirmation of CF diagnosis is recommended in our Centro.

Key-Words: cystic fibrosis, sweat test, *borderline* chloride values, reference values, diagnosis, "non-classic" presentation.

Introdução

A Prova de Suor, desenvolvida na década de 50, por Gibson e Cooke conhecida como *Quantitative Pilocarpine Iontophoresis Test* (QPIT), continua a ser a prova *standard* para a confirmação diagnóstica nos doentes com suspeita clínica de Fibrose Quística (FQ).^{1,2,3,4}

Este método quantifica, com grande fiabilidade, a concentração do ião cloreto (Cl⁻) no suor se realizado de acordo com as normas definidas pelos Organismos Internacionais.^{1,3} É no entanto, frequente, para simplificação, observarem-se adaptações da técnica que levam a resultados falsos positivos ou negativos.^{3,4} Calcula-se uma incidência de erro, na Prova de Suor, de cerca de 10 a 15%, com maior percentagem de falsos positivos, mas também falsos negativos, com as consequências indesejáveis de um diagnóstico não atempado.²

Em 97 a 98% dos doentes a Prova de Suor é patológica. No entanto, 4 a 5 % pode apresentar valores *borderline* entre 40-60mmol/L ou mesmo normais.^{2,5,6} A concentração de Cl⁻ superior ou igual a 60mmol/L é considerada patológica e raramente os valores são superiores a 40mmol/L nas crianças normais. Em 4 a 10% dos adolescentes e adultos normais, podemos encontrar valores superiores, pelo que, neste grupo etário, consideram-se entre 40-70 mmol/L valores *borderline*.^{2,3,6}

Nos últimos anos, a prova *standard* tem sido substituída, em muitos laboratórios, por outras de mais fácil execução, nomeadamente, por métodos que determinam a condutividade dos electrólitos do suor e não a concentração de Cl⁻. Estes, considerados de screening, têm valores de referência diferentes da QPIT, pelo que, para interper-

tação da Prova de Suor, o médico deve questionar qual o método e quais os procedimentos realizados.^{1,2}

O *Macroduct Sweat Collection System* associado ao *Wescor Sweat Check Conductivity Analyzer* é um dos testes simples executado por muitos laboratórios com fiabilidade equivalente ao de Gibson e Cooke^{2,7,8}. Os valores deste método são aproximadamente 15 mmol/L mais elevados do que os do QPIT e, apesar de não haver consenso em aceitá-lo como prova diagnóstica mas só como *screening*, valores superiores a 85-90 mmol/L devem ser considerados patológicos. Valor igual ou superior a 50 mmol/L é duvidoso, sendo obrigatória a referência do doente a Centro Especializado da doença.^{1,2,7,8,9}

O dilema das provas de suor duvidosas é por vezes de difícil resolução. São cada vez mais as referências na literatura de diagnósticos de FQ não confirmados pela Prova de Suor.^{1,12} A identificação de mutações, como teste diagnóstico, justifica-se nos doentes com valores de Cl⁻ ou electrólitos *borderline* e clínica típica ou atípica de FQ.^{4,10,13}

Todavia, as mais de 1200 mutações¹⁴ já identificadas são, em certas situações, mais um factor de confusão diagnóstica do que de esclarecimento.¹⁵ O diagnóstico baseado na biologia molecular tem limitações porque só a presença de duas mutações consideradas de FQ podem confirmar o diagnóstico. Mas o contrário não o exclui.⁴

Porque a medição do transporte iónico reflecte a expressão e função do gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), o qual codifica a síntese da proteína CFTR com função de canal de iões cloreto (Cl⁻), novas técnicas, como a determinação da funcionalidade da proteína a nível do epitélio respiratório nasal e a sua quantificação em biópsias rectais, têm sido desenvolvidas com o objectivo de clarificação do diagnóstico dos casos "atípicos" ou "não clássicos".^{16,17,18,19,20,21}

Estes novos métodos podem vir a ser importantes ajudas na resolução dos dilemas de diagnóstico dos doentes referenciados aos Centros Especializados, com resultados de Provas de Suor duvidosos e que continuam em seguimento, por vezes ao longo de anos.^{4,13}

Ao CEFQ da Clínica Universitária Pediátrica do HSM, são referenciados doentes em idade pediátrica e adulta para confirmação diagnóstica. Do total de doentes em seguimento nos últimos 15 anos, cerca de 25% foram casos duvidosos. A incerteza diagnóstica de FQ, por levantar aos doentes e família problemas sociopsicológicos, e aos médicos éticos, deve ser esclarecida o mais rapidamente possível. Nos últimos 3 anos, tem sido possível realizar no nosso Centro a técnica de medição das correntes intestinais. Os resultados obtidos parecem apoiar a hipótese de que esta constitua no futuro um novo teste diagnóstico de

FQ a ser incluído nos protocolos de confirmação diagnóstica dos casos "não clássicos".^{13,22,23}

População e Métodos

Realizou-se a revisão dos processos clínicos de 54 doentes excluídos (30 do sexo masculino e 24 do sexo feminino), os quais, nos últimos 15 anos, estiveram em seguimento no CEFQ da Clínica Universitária Pediátrica do HSM, com a hipótese diagnóstica de FQ. Os doentes incluídos apresentavam manifestações clínicas sugestivas de FQ e/ou Provas de Suor com valores médios entre 40 a 85 mmol/L.

As Provas de Suor valorizadas para o estudo foram as repetidas no Laboratório de Pediatria da Faculdade de Medicina de Lisboa, por técnica experiente e pelo método do *Macroduct Sweat Collection System* associado ao *Wescor Sweat Check Conductivity Analyzer*.

Um grupo de doentes tinha prova de suor quantitativa do Cl⁻ realizada no Laboratório de Bioquímica do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). O suor foi colhido pelo método do *Macroduct Sweat Collection System* e a análise do Cl⁻ por titulação coulométrica (electrodo de Ag/AgCl).

A caracterização clínica dos doentes foi de acordo com as manifestações da doença: pulmonares, gastrointestinais e das vias aéreas superiores. Foram revistos os resultados dos exames bacteriológicos das secreções respiratórias, realizados no Laboratório de Bacteriologia do HSM, de acordo com a metodologia indicada para o estudo desta patologia.

A função pancreática foi definida pelos resultados da determinação do esteatócrito, da avaliação qualitativa de gorduras fecais, da determinação da elastase fecal e da necessidade de suplementos de enzimas pancreáticos.

Alguns doentes realizaram estudo de biologia molecular, no Laboratório de Genética Humana do INSA, para identificação das 30 mutações que constituem 87% das mutações na população Portuguesa, associadas à FQ.

A um grupo de 8 doentes foi pedido o *scanning* completo das mutações do gene CFTR, na Clinical Molecular Diagnostic Laboratory do City of Hope National Medical Center and Beckman Research Institute dos USA, para identificação de mutações raras em Portugal. Neste grupo, para avaliar a secreção de cloreto no epitélio intestinal, foi realizada a medição das correntes de curto-circuito nas biópsias rectais.

A colheita do material de biópsia foi realizada por Gastroenterologista Pediátrica, na Unidade de Técnicas da Clínica Universitária Pediátrica do HSM, e a análise da medição da diferença de potencial, no Centro de Genética Humana do INSA, em colaboração com investigadores do Instituto de Fisiologia da Universidade de Freiburg.

Resultados

A idade, na altura da referência ao Centro, foi muito variável e, apesar do predomínio dos doentes em idade pediátrica, 5 dos doentes eram adultos.

O período de seguimento regular destes doentes foi em 29 doentes por período inferior a 1 ano, em 14 doentes superior a 1 ano e em 11 doentes superior a 3 anos. Três destes doentes foram acompanhados por um período mais prolongado (cerca de 10 anos).

Clínicamente, 48 doentes (88,8%) apresentavam sintomatologia pulmonar. Dos 11 doentes (20,3%) com quadro gastrointestinal, 8 referiam diarreia e/ou má progressão estaturoponderal, 2 prolapso rectal e 1 cirrose hepática. Em 7 havia referência a queixas respiratórias e de insuficiência pancreática. Num doente a única manifestação foi polipose nasal.

Os exames bacteriológicos das secreções brônquicas, realizados ao longo do período de seguimento destes doentes, foram positivos em 24 doentes. Em 21 estava presente o *Haemophilus influenzae*, isoladamente em 16, em 3 associado a *Pneumococcus* e em 2 a *Staphilococcus aureus*. Três doentes estavam co-colonizados com *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Staphilococcus aureus*.

As Provas de Suor realizadas no nosso Laboratório foram realizadas uma só vez a 7 doentes, 2 vezes a 15, 3 vezes a 23, 4 vezes a 7 e 5 vezes a 2.

Os valores máximos de cada doente foram inferiores a 60mmol/L em 5 doentes, entre 60 e 80mmol/L em 37, igual ou superior a 80mmol/L em 12, dos quais 2 a terem valor máximo de 92 e 97 mmol/L. Os valores mínimos em 34 doentes foram inferiores a 60mmol/L, em 19 situaram-se entre 60 e 80mmol/L e um só doente apresentou um valor mínimo de 85 mmol/L.

No Quadro I, apresentam-se os resultados das provas de suor dos 18 doentes que realizaram o doseamento de cloreto. Em todos se verificaram valores de cloreto inferiores ao patológico e só os doentes nº 5 e 11 continuavam com valores *borderline*.

O estudo genético pela análise DNA "básica" realizada a 28 doentes não identificou as 87% das mutações associadas à FQ na população Portuguesa.

Aos 8 doentes incluídos no estudo das biópsias rectais para medição da secreção de cloreto foi determinada a concentração do ião Cl⁻ no suor (excepto dois), avaliada a função pancreática pela elastase fecal e realizada análise extensiva do DNA.

No Quadro II, estão os resultados destas avaliações, confirmando-se em 6 doentes critérios de exclusão, pela prova de suor quantitativa e, em todos, pela secreção normal de cloreto, a nível do epitélio intestinal.

No doente nº4 identificou-se num alelo a mutação

F508del e no outro alelo a mutação G576A, que poderá não estar associada a FQ e ter que ser considerada um polimorfismo. Este caso, referenciado aos 18 anos por bronquiectasias, isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* nas secreções brônquicas, provas de suor *borderline*, alterações da função pulmonar (mas com Cl⁻ de 30 mmol/L e secreção de Cl⁻ normal no epitélio intestinal), poderá ser uma situação de bronquiectasias, associada a mutação FQ. No entanto, só será possível excluir com toda a certeza o diagnóstico quando se confirmar que a mutação G576A é um polimorfismo. Se o não for, estaremos perante um caso de FQ com Prova de Suor normal.

No doente nº3, pela análise completa do DNA, identificou-se a mutação F1052V e, com grande probabilidade, o polimorfismo M1137R. Este doente, ao contrário do anterior, foi referenciado aos 4 anos por quadro de hipereactividade brônquica e valor máximo de 82 mmol/L na prova de condutividade. Actualmente com 21 anos, a evolução clínica não foi de FQ, a função pulmonar é normal e não apresenta critérios laboratoriais de diagnóstico.

Os doentes nº 17 e 18 foram excluídos, sem quantificação do cloreto, mas sim pelos valores nas Provas de Suor por condutividade inferiores a 80 mmol/L, medição da secreção de cloreto nas células epiteliais normal, análise extensiva do DNA não diagnóstica e evoluções clínicas não sugestivas de FQ, ao longo de 5 e 10 anos, respectivamente, de observação periódica.

Quadro I
Valores das Provas de Suor

Nº doente	Prova de Suor condutividade mmol/L	Prova de Suor método coulométrico mmol/L
1	86	37
2	62	25
3	82	34
4	60	30
5	67	52
6	60	25
7	68	38
8	67	30
9	62	16
10	78	17
11	65	43
12	63	21
13	67	27
14	69	18
15	90	22
16	63	38

Discussão

Pelos resultados deste estudo retrospectivo dos processos de consulta, verificou-se ter havido grande dificuldade na exclusão diagnóstica de alguns casos. Quase 50% dos doentes mantiveram-se em seguimento na Consulta Especializada, por período superior a 1 ano e 20% a 3 anos. Deste grupo, 3 casos mantiveram-se em observação cerca de 10 anos.

Quadro II
Resultados dos testes diagnósticos de doentes excluídos
pele estudo das biópsias rectais

Nº doente	Prova de Suor conductividade mmol/L	Prova de Suor método coulométrico mmol/L	Genotipo	Elastase fecal µg/g fezes	Secreção de Cl ⁻ normal
1	86	37	ni/ni	510	sim
2	62	25	ni/ni	204	sim
3	82	34	F1052V/M1137R	>500	sim
4	60	30	F508del/G576A	227	sim
5	67	52	G576A/ni	425	sim
6	60	25	F508 del /ni	>500	sim
17	73	-	R74W/ni	>500	sim
18	79	-	ni/ni	>500	sim

ni - sem mutações identificadas

As manifestações clínicas eram na grande maioria pulmonares e sobretudo de hiperreactividade brônquica. 40% dos doentes apresentaram infecções das vias aéreas, com isolamento de bactérias. De referir que, pelo facto destes doentes terem a informação diagnóstica de FQ, o isolamento de bactérias nas secreções respiratórias é particularmente valorizado pelo Laboratório. Fora deste contexto, muitos dos *Haemophilus influenzae* isolados seriam considerados flora normal das vias aéreas. Dos 3 doentes colonizados com *Pseudomonas aeruginosa*, um era uma criança de 3 anos que, após tratamento endovenoso, deixou de estar colonizada com *Pseudomonas aeruginosa*. A sua evolução clínica, ao longo de 7 anos, não foi típica de FQ, não se tinham identificado mutações, pelo que foi excluída, quando confirmado o valor de concentração de Cl⁻ de 30mmol/L. Os outros dois doentes eram adultos com bronquiectasias e Cl⁻ normais. Um dos casos é o doente com a mutação mais comum da FQ, a F508del e a G576A no outro alelo, que, pelo consenso actual, deve ser considerada polimorfismo^{13,23}. A demonstração, *in vivo*, do transporte anormal dos iões (pelo doseamento de Cl⁻ no suor e medição da secreção de Cl⁻ no epitélio intestinal) não foi confirmada. Esta doente, por não reunir os critérios diagnósticos clínicos e laboratoriais propostos por consenso^{4,2}, foi orientada para consulta de Pneumologia, com a hipótese remota de FQ e a indicação de aconselhamento genético. A curto prazo, poderá ser-lhe proposto, para maior esclarecimento, a determinação da diferença de potencial nasal. De referir que, apesar do consenso para que a determinação da diferença de potencial nasal seja incluída nos critérios laboratoriais de diagnóstico³, o teste ainda tem limitações, nomeadamente, de reprodutibilidade e standardização da técnica.^{16,23} A sua execução na idade pediátrica nem sempre é conseguida por exigir grande colaboração do doente, pelo que, neste momento, está em estudo um teste modificado para este grupo etário, com menor tempo de realização e doses inferiores das soluções a instilar nas narinas.^{29,30}

Apesar da definição por consenso dos critérios clínicos e laboratoriais exigíveis para o diagnóstico de FQ, têm sido descritos casos de doentes com FQ e valores *borderline* ou mesmo normais de Cl⁻ e/ou genotipos com mutações menos comuns, algumas já correlacionadas com FQ "atípica".²⁷ Em alguns dos casos é colocada a hipótese da base genética das manifestações clínicas serem genes alternativos ou polimorfismos.^{24,28,29,30}

Também estão descritas situações pulmonares crónicas obstrutivas (asma, aspergilose broncopulmonar alérgica) e bronquiectasias generalizadas, com manifestações clínicas de FQ, mas heterozigotia para mutações da CFTR (38499+10KbC>T nas doenças obstrutivas; IVS8-5T e 38499+10KbC>T nas bronquiectasias). Apesar do contexto clínico de doença pulmonar crónica, a presença de uma mutação no gene CFTR nestes doentes não é só por si prova de FQ.^{31,32}

A diversidade das mais de 1200 mutações identificadas no gene CFTR aumenta o dilema diagnóstico. O espectro clínico de FQ alargou-se e aproximadamente 2% dos doentes tem fenotipo atípico, associado frequentemente a mutações menos severas e Provas de Suor com valores de Cl⁻ *borderline*.^{10,11,13}

Apesar da descrição de casos "não clássicos", a regra continua a ser: o diagnóstico de FQ baseia-se fundamentalmente na clínica e no resultado da Prova de Suor.^{4,15,23}

Pelo valor decisivo da Prova de Suor no diagnóstico de FQ, foram elaboradas recomendações para a execução da técnica *gold standard* de Gibson e Cooke.³

As normas definem o equipamento e as etapas do procedimento, nomeadamente: limpeza da pele antes e após estimulação com pilocarpina, quantidade mínima de suor a recolher e análise electrolítica. As exigências técnicas na sua execução são cruciais para a fiabilidade da prova, pelo que o problema do controlo de qualidade dos laboratórios tem sido colocada pela *Cystic Fibrosis Foundation dos USA*³³ e pela *Cystic Fibrosis Trust do UK*.³⁴ Os resultados das auditorias realizadas nos USA e UK concluíram existir, entre os laboratórios significativas variantes na execução da prova e nos resultados obtidos, chamando-se a atenção para o facto de que valores superiores a 160mmol/L não são fisiologicamente possíveis, sugerindo erro na técnica.^{33,34} A realidade nacional é desconhecida, mas a nossa percepção é de uma grande variabilidade de procedimentos, com grande probabilidade de termos uma percentagem elevada de resultados falsos negativos e positivos. A creditação dos laboratórios com experiência para a realização da Prova de Suor torna-se imprescindível. De acordo com as recomendações do UK, a prova deve ser realizada por técnicos com uma experiência mínima de 10 provas e o laboratório deve realizar, no mínimo, 50 análises por ano.³⁴

Relativamente aos valores na QPIT, consideram-se:

valores normais : inferiores a 40 mmol/L

valores duvidosos: de 40 a 60 mmol/L

valores patológicos: superiores a 60mmol/L

Se o método utilizado for o *Macroduct®* para a recolha e posterior medição da condutividade, por não ser considerado diagnóstico mas sim de *screening*, indica-se que doente, com valores superiores a 50mmol/L, deve ser sempre orientado para centros de diagnóstico. Existe discrepância entre este valor definido pela *Cystic Fibrosis Foundation* dos USA e o apresentado pelo fabricante do *Sweat Check (Wescor)*, o qual recomenda considerarem-se resultados de condutividade < 60mmol/L como normais, e >80mmol/L como sugestivos de FQ.^{1,2,4,8}

Um estudo alargado e comparativo entre o teste de condutividade e o *gold standard* demonstrou resultados equivalentes, pelo que foi proposto que o *Sweat Check (Wescor)* venha a ser considerado de diagnóstico. Neste estudo consideraram-se valores ≥ 90 mmol/L como confirmativos de FQ, como valores duvidosos entre 75 e 89 mmol/L e valores < 75mmol/L como normais.⁸

Na nossa população, nenhum doente excluído persistiu com valores no teste de condutividade superiores a 90mmol/L. No entanto, os resultados preliminares de estudo com 43 doentes, cujo objectivo era avaliar o impacto no diagnóstico da medição da secreção de Cl^- a nível do epitélio intestinal, confirmaram o diagnóstico por este método em 3 doentes com valores de condutividade de 70 mmol/L, 78mmol/L e 88mmol/L. De realçar que a análise extensiva do DNA em dois destes doentes com a mutação F508del num alelo identificou mutação no outro alelo. O outro doente continua sem mutações identificadas.

Apesar da permissa básica dos consensos de diagnóstico ser a clínica, a confirmação ou exclusão de diagnóstico de FQ atempada e com um certo grau de certeza é essencial. Os doentes devem beneficiar do acompanhamento em Centros Especializados e aconselhamento genético, e os casos duvidosos devem ser esclarecidos o mais rapidamente possível, já que a exclusão do diagnóstico de uma doença com prognóstico reservado tem implicações no projecto de vida do doente e família, bem como nos custos.

Neste contexto, defendemos que os doentes com suspeita clínica e Prova de Suor inconclusiva devem ser sempre enviados para um Centro Especializado com possibilidade de confirmação diagnóstica.

As abordagens multidisciplinares e integradas, estabelecidas com o grupo de investigação de FQ do INSA, permitem-nos agora realizar a Prova de Suor quantitativa, medir as correntes de curto-circuito nas biópsias rectais e, a curto prazo, a medição dos potenciais nasais. Também, com a análise extensiva do DNA, para identificação das mutações raras na nossa população, consegue-se maior eficácia no diagnóstico molecular.

A abordagem para o esclarecimento do diagnóstico nos doentes com Provas de Suor *borderline*, formas de apresentação e evoluções clínicas ditas "não clássicas" ou "atípicas", pode ser agora realizada num mais curto espaço de tempo.

Em consequência deste novo enquadramento, estabeleceu-se para o nosso Centro um novo protocolo de diagnóstico sequencial (Fig. 1).

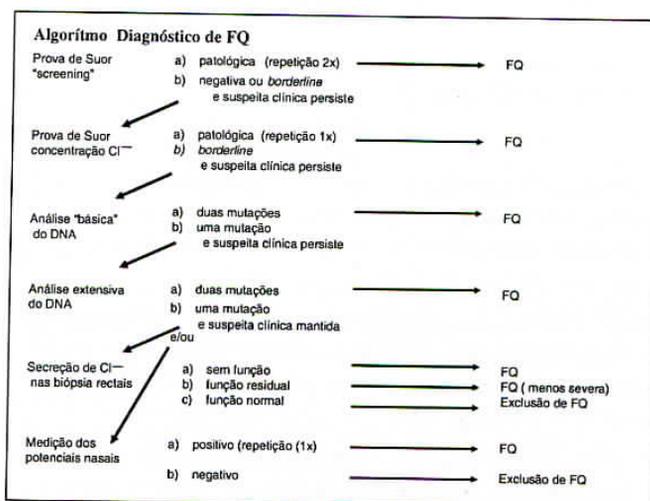


Fig. 1

Bibliografia

- LeGrys VA. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: Practical considerations. *J Pediatr* 1996; 129: 892-7.
- Rossenstien BJ. Diagnosis. Hodson ME, Geddes DM. (ed) *Cystic Fibrosis*, 2nd ed London, Arnold. 2000: 178-88.
- Quinton PM. The Sweat Gland. In Yankaskas J, Knowles M (ed) *Cystic Fibrosis in Adults*. Lippincott-Raven Philadelphia, 1999: 419-37.
- The Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Statement. Clinical Practice Guidelines for Cystic Fibrosis Committee. *Cystic Fibrosis Foundation* ed USA 1997 Appendix I, Vol VII: 1-15
- Wallis C. Diagnosing cystic fibrosis: blood, sweat, and tears. *Arch Dis Child* 1997; 76: 85-91
- Farrell PM, Kosciak RE. Sweat Chloride Concentrations in Infants Homozygous or Heterozygous for F508 Cystic Fibrosis. *Pediatrics* 1996; 97: 524-28.
- Hammond KB, Turcios 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.
- 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.
- Cystic Fibrosis Foundation, Center Director Committee. Update 1. Bethesda: CFF, 1993.
- Goodchild MC, Watson E. Diagnostic methods and screening. Hodson ME, Geddes DM (ed). *Cystic Fibrosis*. Chapman and Hall, London, 1995: 180-211
- Crowley S, Bush A. Cystic Fibrosis: keeping it in the family. *Pediatr Pulmonol* 2002; 33: 158-61.
- Lebecque P, Leal T, Godding V. Cystic fibrosis and normal sweat

- chloride values: a case-report. *Rev Mal Respir*.2001; 18: 443-5.
13. Kerem E, Kerem B. Genotype-phenotype Correlations in Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996; 22: 387-395.
 14. CFTR Mutation Database 20. Set. 2003, <http://www.genet.sick-kids.on.ca>.
 15. Rosenstein BJ: Cystic Fibrosis Diagnosis: New Dilemmas for an old Disorder. *Pediatr Pulmonol* 2002; 33: 83-4.
 16. Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, Tsui L-C, Corey M, Levison H, Durie P. Correlation of sweat chloride concentration with classes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *J Pediatr* 1995; 127: 705-10.
 17. Ahrens RC, et al. Use of Nasal Potencial Difference and Sweat Chloride as Outcome Measures in Multicenter Clinical Trials in Subjects with Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2002; 33: 142-50.
 18. Mall M, Bleich M, Kuehr J, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K (1999) "CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis" *Am J Physiol* 277, G709-G716.
 19. Mall M, Wissner A, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K (2000) "Defective cholinergic Cl⁻ secretion and detection of K⁺ secretion in rectal biopsies from cystic fibrosis patients" *Am J Physiol Liver Physiol* 278, G617-24.
 20. Veeze HJ, Sinaasappel M, Bijman J, Bouquet J and de Jonge HR. Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis; *Gastroenterology*; (1991) 101: 398-403.
 21. Veeze HJ, Halley DJ, Bijman J, de Jongste JC, de Jonge HR and Sinaasappel M. Determinants of mild clinical symptoms in cystic fibrosis patients. Residual chloride secretion measured in rectal biopsies in relation to the genotype: *J Clin Invest* (1994) 93: 461-6.
 22. Barreto C, Mall M, Amaral M. Assessment of CFTR Function in Native epithelia for the Diagnosis of Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, Suppl 2004; 26: 24331.
 23. Rosenstein BJ. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr* 1998; 32: 589-95.
 24. Davis P, Drumm M, Konstan M. Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1229-56
 25. Wallace HL, Barker PM, Southern KW. Nasal Airway Ion transport and Lung Function in Young People with Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 594-600.
 26. Massie J, Robinson P. Cystic Fibrosis: The Twilight Zone. *Pediatr Pulmonol* 1999;28:222-4.
 27. Rosenstein BJ. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr* 1998; 32: 589-95.
 28. Wilson DC, et al. Uncertainty in the diagnosis of cystic fibrosis: Possible role of in vivo potencial difference measurements. *J Pediatr* 1198; 132: 596-9.
 29. Leal T, Lebacqz J, Lebecque P, Cumps J, Wallemacq P (2003). Modified method to measure nasal potential difference. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(1): 61
 30. Southern K, et al. A modified technique for measurement of nasal transepithelial potencial difference in infants. *J Pediatr* 2001; 139: 353-8.
 31. Hull J, Thomson AH, Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 1998; 53: 1018-21.
 32. Bombieri C, Belpinati F, Luisetti M, Pignatti. Chronic Pulmonary Disease. Symposium at the Thirteenth Annual North American Cystic Fibrosis Conference Seattle. *Pediatr Pulmonol* 1999; suppl 19 :93-94.
 33. Barreto C, Fibrose Quística. Maria João Marques Gomes e Renato Sotto-Mayor (ed), *Tratado de Pneumologia*. Permanyer Portugal 2003, Vol 1; 927-43.
 34. LeGrys VA. Sweat Analysis Proficiency Testing for Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000; -30: 476-480.
 35. 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: 1126-27.