

Fibrosi cistica e test del sudore

La fibrosi cistica (FC) rappresenta la più frequente malattia genetica letale nelle popolazioni caucasiche: una diagnosi accurata e precoce è fondamentale per una buona gestione della malattia. Descritto per la prima volta nel 1959, il test del sudore eseguito con la metodica di Gibson e Cooke rimane tuttora il "gold standard" per la diagnosi di FC¹⁻⁴. Recentemente Baumer³ ha pubblicato un'interessante revisione delle linee guida sull'esecuzione del test del sudore che fa riferimento a quelle pubblicate in Gran Bretagna da un gruppo multidisciplinare di studio sull'argomento, analizzando il livello di evidenza della singola linea guida secondo lo schema riportato in *Tabella 1* (nel testo che segue, ove possibile, si farà riferimento al "recommendation grade" di quanto scritto seguendo tale fonte bibliografica).

Come mai nel sudore c'è la chiave della FC?

In realtà, la chiave è nel DNA e nella diagnosi genetica, ma il sudore offre ancora il criterio diagnostico di più facile e immediato accesso. Il gene FC, la cui mutazione è responsabile della fibrosi cistica, codifica per una proteina denominata CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), la quale esplica diverse funzioni. Una delle più importanti è la regolazione del trasporto di sodio e cloro attraverso il polo apicale delle cellule epiteliali (*Figura 1*): un difetto in tale controllo induce un aumento delle concentrazioni di sodio e cloro nel sudore e in altri escreti. Tale aumento può essere rilevato attraverso il test del sudore.

Il test del sudore richiede una preparazione speciale del paziente?

Il test del sudore è un test non invasivo dotato di una specificità molto buona, che non richiede alcuna preparazione del paziente; in particolare non è necessario il digiuno e neppure la sospensione delle eventuali terapie farmacologiche in corso; si esegue ambulatorialmente e, durante la sua esecuzione, il bambino può stare tranquillamente in braccio alla madre. Il test può essere effettuato anche nei neonati che abbiano almeno due settimane di vita (nella prima settimana le concentrazioni di cloro e sodio nel sudore possono essere ele-

IL TEST DEL SUDORE

VALENTINA KIREN, LAURA TRAVAN, ELSA BARTH

Clinica Pediatrica, IRCCS "Burlo Garofalo", Università di Trieste

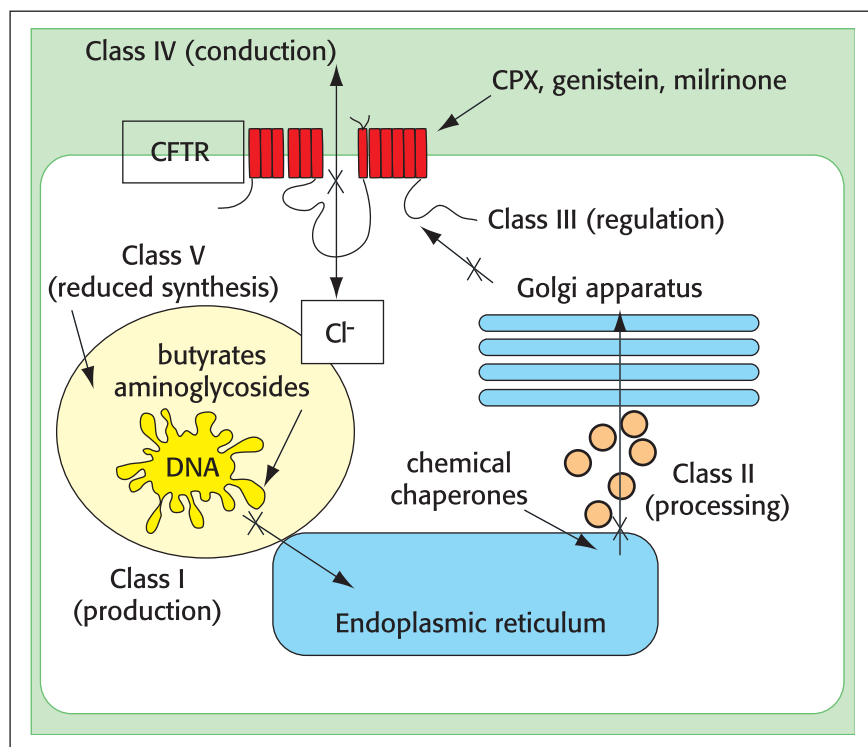


Figura 1. Meccanismo d'azione della proteina CFTR e classi di mutazioni (adattata da voce bibliografica 4).

CLASSIFICAZIONE DEI LIVELLI DI EVIDENZA		
Grado A	I a	Evidenza ottenuta da meta-analisi di trials randomizzati controllati
	I b	Evidenza ottenuta da almeno un trial randomizzato controllato
Grado B	II a	Evidenza ottenuta da almeno uno studio controllato "ben disegnato" senza randomizzazione
	II b	Evidenza ottenuta da almeno uno studio descrittivo di tipo "quasi-sperimentale"
	III	Evidenza ottenuta da studi ben disegnati, descrittivi e non sperimentali come studi comparativi, di correlazione e case reports
Grado C	IV	Evidenza ottenuta da reports di "expert committee" o pareri e/o esperienze cliniche di autorità di rilievo

Adattata da voce bibliografica 3

Tabella 1

vate), se il neonato è di peso adeguato (superiore ai 3 kg), se non presenta malattie sistemiche di rilievo ed è normal-

mente idratato (grado C; cfr. *Tabella*). In ogni caso la quantità di sudore raccolta non deve essere inferiore ai 75 mg.

CRITERI DIAGNOSTICI DI FC

Presenza di 1 o più manifestazioni cliniche
 oppure
 Fratello con FC
 oppure
 Screening neonatale positivo
 più
 2 test del sudore positivi
 oppure
 2 mutazioni cf
 oppure
 Potenziali nasali alterati

I criteri diagnostici di FC prevedono la presenza di una clinica suggestiva o di una stretta familiarità o di uno screening neonatale positivo, associati all'evidenza di una disfunzione del CFTR, dimostrata dalla positività di almeno due test del sudore (eseguiti in due giorni diversi) o dalla presenza di due mutazioni FC su ciascun allele o da potenziali nasali risultati anormali in due occasioni diverse⁴.

Tabella II

INDICAZIONI AL TEST DEL SUDORE

- Anamnesi familiare positiva per FC
- Screening neonatale positivo per FC
- Diagnosi prenatale (familiarità, ipercogenicità intestinale)
- Sintomi gastrointestinali/nutrizionali suggestivi di FC (vedi Tabella IV)
- Sintomi respiratori (sinu-polmonari) (vedi Tabella V)
- Sindromi da perdita di sali (deplezione acuta, alcalosi metabolica cronica)
- Agenesia dei vasi deferenti/altre forme di azoospermia ostruttiva (maschi)

*Adattata da voci bibliografiche 7 e 8

Tabella III

SINTOMI GASTROINTESTINALI SUGGERITIVI DI FC

- Ileo da meconio
- Ostruzione intestinale distale
- Prolasso rettale
- Steatorrea/insufficienza pancreaticata
- Pancreatiti ricorrenti
- Epatopatia cronica (cirrosi biliare focale o multilobulare)
- Colestasi/ittero colostatico neonatale protratto
- Ritardo di crescita/malnutrizione proteico-calorica
- Ipoprotidemia
- Complicanze secondarie a deficit di vitamine solubili

Tabella IV

SINTOMI RESPIRATORI SUGGERITIVI DI FC

- Colonizzazione/infezione persistente da patogeni suggestivi di FC (*B. cepacia*, *Ps. aeruginosa*, *H. influenzae* non tipizzabile, *St. aureus*)
- Tosse produttiva cronica
- Alterazioni radiografiche persistenti (bronchiectasie, atelettasia, infiltrati, iperinflazione)
- Sindromi respiratorie ostruttive: wheezing, air trapping
- Poliposi nasale
- Sinusiti ricorrenti/alterazioni radiografiche dei seni paranasali
- Ippocratismo digitale

Tabella V

Il test del sudore è perfettamente affidabile?

L'esecuzione del test richiede grande accuratezza, e la sua affidabilità dipende in larga misura dalla qualità delle procedure di raccolta e di analisi, in sostanza dall'esperienza: la *Cystic Fibrosis Foundation*⁵ suggerisce che il test del sudore, per essere ritenuto attendibile, debba essere eseguito con la metodica di Gibson e Cooke (raccolta dopo iontoforesi pilocarpinica) in un Centro che ne abbia una pratica quasi quotidiana, definita come un numero annuo di almeno 200 test per singolo operatore. Sensibilità e specificità del test di Gibson e Cooke sono in teoria abbastanza buone, e comunque nettamente superiori ad altre tecniche⁶: i falsi positivi sono il 2%, i falsi negativi possono arrivare al massimo al 6%.

Tuttavia, bisogna anche dire che questi numeri non sono veri sempre e dappertutto, e che una certa cautela è sempre necessaria nel valutare i risultati, sia positivi che negativi.

Quando richiedere il test del sudore?

I criteri di diagnosi della FC, aggiornati nel 1998 dal Consensus della *Cystic Fibrosis Foundation*⁴, sono elencati nella Tabella II.

Sulla base di tali criteri, il test del sudore va richiesto nei familiari di pazienti con FC; nei bambini che siano risultati positivi allo screening neonatale; nei bambini con ileo da meconio; nei casi di shock ipocloremico da calore; nei bambini con segni sospetti di broncopneumopatia cronica (tosse con broncorrea ricorrente o persistente, radiologia sospetta, polmoniti ripetute e/o a lenta risoluzione, pansinusite persistente, anche wheezing); malnutrizione e/o edema; ipoprotidemia e/o steatorrea; ritardo nella ripresa ponderale del primo mese di vita (Tabelle III, IV, V).

Come si esegue?

L'esecuzione del test del sudore avviene in tre fasi:

- stimolazione delle ghiandole sudoripare (iontoforesi pilocarpinica)
- raccolta del sudore
- valutazione analitica (dosaggio di cloro e sodio)

La procedura per l'esecuzione del test è descritta nel Box 1.

Quali cautele sono necessarie per ottenere la migliore attendibilità?

L'esecuzione del test è alquanto delicata, in quanto richiede molti passaggi manuali che possono causare errori. Diversi studi mostrano che, fra le tre fasi, quella che più frequentemente induce risultati erronei è la raccolta, per processi di evaporazione e formazione di condensati. La probabilità di errore umano è altresì inversamente proporzionale al numero di test eseguiti dall'operatore¹⁰. Considerando la delicatezza che comporta formulare una diagnosi di fibrosi cistica, si comprende come la comunità scientifica internazionale sia preoccupata di tenere continuamente aggiornate le linee guida per l'esecuzione del test^{2,3}.

In particolare viene raccomandato di non eseguire il test del sudore se il bambino ha febbre elevata, se la superficie cutanea su cui dovrebbe essere condotto il test è affetta da dermatite, se è presente edema (grado C), se il soggetto è in trattamento con steroidi per via sistemica (grado C), se il soggetto necessita di ossigeno o ventilazione assistita (grado C).

Quali sono i limiti della normalità e le cautele per valutarla?

Secondo i criteri stabiliti dall'ultima Consensus della *Cystic Fibrosis Foundation*, il test si considera negativo se il valore del cloro è inferiore a 40 mmol/l, dubbio o borderline (con la necessità di ripetere il test), se il valore è compreso tra 40 e 60 mmol/l; e infine patologico se il valore supera 60 mmol/l (grado B III; vedi Tabella I).

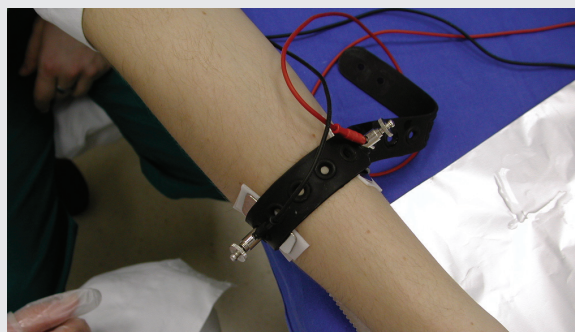
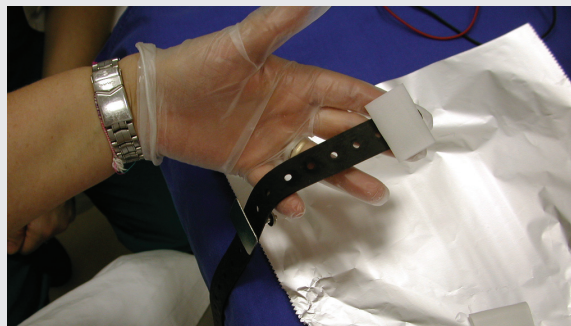
Il dosaggio del sodio è comunque indicato: nei pazienti con FC, entrambi gli elettroliti, cloro e sodio, dovrebbero essere proporzionalmente elevati e il rapporto Cl/Na dovrebbe essere maggiore di 1. Valori diversi rappresentano un'indicazione a ripetere il test anche più volte per accertare che il dosaggio degli elettroliti non sia stato falsato da circostanze sfavorevoli. La Consensus stabilisce inoltre che concentrazioni di cloro superiori a 160 mmol/l siano fisiologicamente impossibili e sicuramente legate a un errore nella raccolta del campione, che dovrà quindi essere ripetuta¹¹.

Nei casi in cui il test risulti positivo, questo andrà ripetuto per conferma almeno due volte, richiedendo nel frattempo un'analisi genetica del gene CFTR ed

Box 1 - PROCEDURA PER L'ESECUZIONE DEL TEST DEL SUDORE

Prima fase

Sul primo elettrodo, che verrà applicato sul lato volare dell'avambraccio, si pone una speciale carta filtro impregnata di una soluzione di nitrato di pilocarpina allo 0,5% (sostanza che favorisce la produzione di sudore da parte delle ghiandole sudoripare); sul secondo elettrodo, che verrà collocato sulla superficie dorsale dello stesso avambraccio si pone un'altra striscia di carta filtro impregnata di soluzione salina di nitrato di sodio all'1%.



Si collegano i due elettrodi a un amperometro in grado di far passare un flusso di corrente di 2 mA per un periodo di circa 5 minuti (al polo positivo l'elettrodo con la soluzione pilocarpinica e al polo negativo quello con la soluzione salina); questa corrente elettrica a bassissimo vol-

taggio non è assolutamente dolorosa (può provocare un lieve formicolio sulla porzione di pelle interessata) e permette alla pilocarpina di penetrare rapidamente all'interno della cute. Al termine dei 5 minuti si rimuovono gli elettrodi e la carta assorbente, e si pulisce la cute con acqua distillata (così facendo si eliminano gli elettroliti dalla cute, partendo da una situazione che possiamo considerare "neutra").

Seconda fase

Si ricopre la zona cutanea in cui è penetrata la pilocarpina (circa 5 cm²) con un'altra porzione di carta filtro asciutta, precedentemente pesata, che viene ricoperta con una mantellina di plastica, strettamente fissata alla cute con pellicola adesiva. Al termine del periodo di raccolta, della durata non inferiore ai 20 minuti e non superiore ai 30 minuti (grado B III), la carta filtro viene rimossa e ripesata per determinare la quantità di sudore raccolto; per una interpretazione corretta del test, dovrebbero essere raccolti almeno 75 mg di sudore che corrispondono a una produzione di sudore da parte delle ghiandole di almeno 1 g/m²/min. Sono determinanti a tale scopo la superficie della carta filtro (5,1 x 5,1 cm) e il periodo di raccolta, poiché al loro variare si modifica il volume minimo di sudore raccolto. Se non si raggiunge la quantità minima necessaria, il test deve essere ripetuto.

Terza fase

Consiste nel dosaggio quantitativo del contenuto di cloro e di sodio del campione che viene eseguito in laboratori attrezzati.

escludendo diagnosi alternative e possibili cause di falsa positività.

Il test ha lo stesso valore a tutte le età?

Diversi Autori ritengono che nei bambini di età inferiore ai tre mesi una concentrazione di cloro superiore a 40 mmol/l sia già altamente suggestiva di FC e che valori compresi tra 30 e 40 mmol/l siano da considerare dubbi e da riconfermare nel tempo¹² o meritino un'analisi genetica approfondita¹³.

Anche per quanto riguarda le altre fasce di età vi possono essere difficoltà nell'interpretazione dei risultati. In particolare sembra che il 10% degli adolescenti sani abbia nel sudore concentrazioni di sali superiori a 60 mmol/l. In questi soggetti il test di soppressione con fluidrocortisone può essere dirimente: la somministrazione orale di 9-alfa-fluidrocortisone (3 mg/m²/die per 2 giorni) aumenta il riassorbimento elettrolitico attraverso la pompa per il Cl⁻ (CFTR), riportando i valori del test nella norma nei pazienti sani ma non in quelli affetti da FC¹.

Ci sono falsi positivi?

Abbiamo già detto come la specificità del test del sudore sia molto buona: nell'1-2% dei casi è tuttavia possibile ottenere dei risultati falsamente positivi.

Oltre ai falsi positivi legati a una non corretta esecuzione del test o a errori nell'analisi del campione - quota minima se il test è effettuato in un Centro di riferimento - vi sono alcune condizioni patologiche che possono determinare un incremento della concentrazione del cloro nel sudore (Tabella VI). Quella di più frequente riscontro in età pediatrica è la dermatite atopica. Ma anche la malnutrizione, sia organica (celiachia) che psicogena¹⁴, può costituire al tempo stesso un'indicazione all'esame e una causa di errore diagnostico. Peraltro, la diagnosi di FC non viene mai fatta su un solo test positivo: ogni test positivo va dunque ripetuto per conferma. Di fronte a un dubbio diagnostico è consigliabile richiedere l'analisi genetica e/o valutare i potenziali nasali (Box 2).

Ci sono falsi negativi?

Un test positivo deve sempre essere ripetuto, e questo elimina quasi del tutto i falsi positivi. Diversa è la situazione per i falsi negativi, poiché difficilmente un test dato per negativo verrà ripetuto. Da uno

CONDIZIONI ASSOCIATE AD ELEVATA CONCENTRAZIONE DI CLORO NEL SUDORE

- Malattie da accumulo (glicogenosi tipo I, mucopolisaccaridosi, fucosidosi)
- Endocrinopatie (diabete insipido nefrogenico, ipotiroidismo, ipoparatiroidismo, insufficienza surrenalica non trattata, pseudoipoadosteronismo)
- Celiachia ed altre cause di malnutrizione
- Colestasi familiare, pancreatiti
- Dermatite atopica
- Disfunzione autonoma, displasia ectodermica
- Farmacoterapie (alcuni diuretici, infusione di prostaglandina E)
- Errori metodologici (evaporazione del campione, errore di misurazione)

Adattata da voci bibliografiche 2, 14, 15, 16

Tabella VI

CAUSE PIÙ FREQUENTI DI FALSI NEGATIVI AL TEST DEL SUDORE

- Errori metodologici (cattiva esecuzione del test)
- Alcune mutazioni (A455E, R347H, G551S, D1152H, R117C, 3849 + 10KBC→T, R117H-7T, 5T)
- Forme atipiche (sufficienza pancreatica/assenza di sintomi respiratori/una sola mutazione riconosciuta)
- Edema ipoprotidemico
- Disidratazione con iperaldosteronismo secondario

Tabella VII

studio statunitense è risultato che addirittura il 12% dei pazienti con FC aveva inizialmente un test del sudore negativo e che nel 41% dei casi il ritardo diagnostico aveva portato a un aggravamento della morbilità¹⁸.

Diversi fattori, elencati nella Tabella VII, possono contribuire a determinare la falsa negatività del test ed è per questo che risultati negativi o borderline non dovrebbero essere accettati come definitivi se la clinica è fortemente suggestiva.

E i valori borderline?

Sì, esiste il problema dei soggetti che presentano ripetutamente test del sudore borderline. Diversi studi hanno messo in luce questo fenomeno, evidenziando una quota di soggetti con fibrosi cistica con test del sudore non francamente positivo. Nel loro studio Desmarquest et al.¹⁹ hanno selezionato, dal 1988 al 1998, 24 bambini afferenti alla clinica pneumologica pediatrica dell'Ospedale Trousseau di Parigi per patologie polmonari, che avevano presentato test del sudore borderline in 2 o più occasioni, analizzando il genotipo e le manifestazioni cliniche. L'analisi genetica ha permesso di individuare 3 pazienti (12,5%) con fibrosi cistica (di cui uno omozigote $\Delta F508$, con

insufficienza pancreatica ed escreato positivo). Nel 2002 Padoan et al.¹³ hanno individuato, in una casistica di 104 pazienti con FC diagnosticata oltre l'anno di età, 6 soggetti che erano stati classificati come portatori allo screening neonatale avendo IRT elevata e presenza di una mutazione $\Delta F508$ ma test del sudore negativo o borderline. Tutti i soggetti, rivalutati a distanza di tempo, risultarono portatori di una seconda mutazione, quasi tutti avevano una sintomatologia suggestiva, ma solo in due casi il test del sudore si era positivizzato. Infine Lebecque et al.²⁰ hanno ritrovato, su 43 soggetti di età inferiore a 18 anni con test del sudore borderline, 10 individui con mutazione su entrambi i cromosomi (1 su 4), di cui 5 con potenziali nasali alterati e tutti tranne uno con sintomi suggestivi di FC.

In conclusione?

Sarebbe opportuno valutare i risultati del test non solo sulla mera base numerica, ma anche tenendo conto dell'età del bambino e, soprattutto, della sintomatologia: casi dubbi andrebbero sempre rivalutati e seguiti secondo il giudizio clinico, in particolare in presenza di sintomi suggestivi per FC, di familiarità o di scree-

Box 2 - MISURAZIONE DELLA DIFFERENZA DI POTENZIALE NASALE (o potenziali nasali)^{15, 17}

I potenziali nasali, quando correttamente eseguiti, hanno una sensibilità maggiore del test del sudore ma la loro esecuzione è più lunga del test del sudore, molto più complessa; richiede maggiore collaborazione da parte del paziente, macchinari e tecnici specializzati, e frequenti controlli dei reagenti. Per tale motivo attualmente tale test si pratica solo in alcuni centri e non è di impiego routinario ma viene riservato ai casi dubbi o in cui non è possibile eseguire il test del sudore (es. anomalie delle ghiandole sudoripare).

La procedura avviene in tre tempi:

1. Si posizionano due elettrodi attraverso cui si misura una differenza di potenziale: l'elettrodo esplorativo è costituito da un cateterino di polietilene riempito di soluzione salina, applicato a livello della mucosa del turbinato nasale inferiore mentre l'elettrodo di riferimento è un ago riempito di soluzione salina posizionato nell'avambraccio. Il voltaggio che si misura è correlato ai movimenti di sodio attraverso la membrana cellulare. I valori normali si aggirano attorno ai $-24.7+/-0.9$ mV. Nei pazienti con fibrosi cistica, a causa dell'alterato funzionamento del trasporto di cloro e quindi di sodio dovuto alla mutazione del gene CFTR, i valori risultano diminuiti ($-53+/-1.8$ mV).
2. La misurazione va ripetuta dopo perfusione della mucosa con amiloride, che blocca il canale del sodio epiteliale, provocando una caduta del potenziale che risulta essere molto maggiore nei soggetti con fibrosi cistica rispetto ai controlli sani.
3. Una successiva perfusione della mucosa con una soluzione priva di cloro e con isoproterenolo induce in genere un deciso aumento nella differenza di potenziale (di circa 30 mV) ma non sortisce alcun effetto quando la funzione del CFTR è alterata.

ning neonatale positivo, anche quando la negatività del test del sudore (sulla base degli attuali criteri) e degli altri test diagnostici renda impossibile formalizzare la diagnosi di FC (potenziali nasali negativi, individuazione di una sola mutazione). In questi casi l'orientamento del clinico può essere supportato dai cosiddetti test ancillari (microbiologia dell'escreato, valutazione dei seni paranasali, valutazione quantitativa della funzione pancreatica, spermogramma).

Una nuova proposta parte dal lavoro di Augarten et al.²¹ che ha utilizzato il dosaggio del CA19-9 (marker tumorale spesso elevato in pazienti con FC) quale test aggiuntivo per la diagnosi di FC nei pazienti con test borderline. Essi hanno infatti riscontrato valori elevati di CA19-9 nel 60% dei pazienti con FC classica esaminati, nel 46% dei pazienti che non soddisfano tutti i criteri diagnostici (eterozigoti con test del sudore negativo o borderline e sufficienza pancreatica) e solo nel 5% dei controlli ($p < 0,01\%$).

Nell'attesa di trovare nuovi strumenti diagnostici più sensibili è stata proposta la categoria di "FC-like diseases" o di "CF-

TR-related" o "associated diseases" per includere quei pazienti con potenziale fibrosi cistica che non trovano posto nei criteri diagnostici classici. Il problema pare per ora esclusivamente semantico. In effetti, nelle conclusioni di diversi lavori citati, gli Autori sono unanimi nel ribadire la necessità per quei soggetti che presentano una sintomatologia importante, di essere trattati e seguiti come se avessero la fibrosi cistica.

Bibliografia

1. Wallis C. Diagnosis of cystic fibrosis; blood, sweat and tears. *Arch Dis Child* 1997;76:85-91.
2. NCCLS. Sweat testing: Sample collection and Quantitative Analysis: Approved Guideline- Second Edition. NCCLS document C34-A2 [ISBN 1-56238-407-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania USA, 2000.
3. Baumer JH. "Evidence based guidelines for the performance of sweat test for the investi-

gation of cystic fibrosis in UK. *Arch Dis Child* 2003;88:1126-7.

4. Rosenstein BJ, et al. "The diagnosis of cystic fibrosis: a Consensus Statement. *J Pediatr* 1998;132(4):589-95.

5. Cystic Fibrosis Foundation. The diagnosis of Cystic Fibrosis. Consensus Statement. Consensus Conference, 1996, VII: sect.1.

6. Rosenstein BJ, Zeitlin PL. Cystic fibrosis. *Lancet* 1998;351:277-82.

7. Mastella G. Fibrosi cistica. Da: Argomenti di Malattie respiratorie infantili. Pisa, Pacini editore, 1998:95-142.

8. Salvatore D, Marchetti F, D'Andrea N, Schiavo MV. La fibrosi cistica in Basilicata: aspetti epidemiologici, clinici ed assistenziali. *Bollettino OER* 2001;vol. 1:12-15.

9. Vazquez C, Azcarate MJ, Sojo A, et al. Results of the sweat test, carried out by 2 methods, for the diagnosis of cystic fibrosis. *An Esp Pediatr* 1987;26(1):33-6.

10. Webster HL. Laboratory diagnosis of cystic fibrosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1983;18(4): 313-38.

11. Rosenstein BJ. What is a cystic fibrosis diagnosis? *Clin Chest Med* 1998;19(3):423-41.

12. Farrell PM, Kosciak RE. Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for DF508 cystic fibrosis. *Pediatrics* 1996;97:524-8.

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

14. Ruddy RM, Scanlin TF. Abnormal sweat electrolytes in a case of celiac disease and a case of psychosocial failure to thrive. Review of other reported causes. *Clin Pediatr* 1987; 26(2):83-9.

15. Stern RC. The Diagnosis of Cystic Fibrosis. *NEJM* 1997;336(7):487-91.

16. Nelson. *Textbook of Pediatrics*, 17th edition, pg. 1441-2.

17. Southern KW, Noone PG, Bosworth DG, LeGrys VA, Knowles MR, Barker PM. A modified technique for measurement of nasal transepithelial potential difference in infants. *J Pediatr* 2001;139:353-8.

18. Le Grys VA, Wood RE. Incidence and implications of false-negative sweat test reports in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1988;4(3):169-72.

19. Desmarquest P, Feldmann D, Tamalat A, Boule M, Faurox B, Tournier G, et al. Genotype Analysis and Phenotypic Manifestations of Children with Intermediate Sweat Chloride Test Result. *Chest* 2000;118:1591-7.

20. 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 Respi Crit Care Med* 2002;165:757-61.

21. Augarten A, Berman H, Aviram M, Diver-Habber A, Akons H, Ben TL, et al. Serum CA 19-9 levels as a diagnostic marker in cystic fibrosis patients with borderline sweat tests. *Clin Exp Med* 2003;3 (2):119-23.