

Iwona Stelmach, Katarzyna Bal-Gierańczyk, Marta Szarkowska

Atypowa postać mukowiscydozy u 14-letniego chłopca

Atypical cystic fibrosis diagnosed in a 14-year-old boy

Oddział Kliniczny Interny Dziecięcej i Alergologii III Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika w Łodzi, Łódź, Polska
Adres do korespondencji: Prof. dr hab. n. med. Iwona Stelmach, Oddział Kliniczny Interny Dziecięcej i Alergologii III Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika, al. Piłsudskiego 71, 90-329 Łódź, tel.: +48 42 689 59 72, e-mail: alergol@kopernik.lodz.pl

Department of Paediatrics and Allergy, Copernicus Memorial Hospital, Medical University of Lodz, Łódź, Poland
Correspondence: Professor Iwona Stelmach, MD, PhD, Department of Paediatrics and Allergy, N. Copernicus Hospital, Medical University of Lodz, Piłsudskiego 71, 90-329 Łódź,
Poland, tel.: +48 42 689 59 72, e-mail: alergol@kopernik.lodz.pl

Streszczenie

Rozpoznanie mukowiscydozy opiera się na występowaniu objawów klinicznych oraz obecności dwóch mutacji genu odpowiedzialnego za syntezę błonowego kanału chlorkowego. Jednakże w przypadkach atypowej postaci mukowiscydozy nie wszystkie objawy mogą się ujawniać, a wyniki badań diagnostycznych nie zawsze muszą potwierdzać chorobę. Światowa Organizacja Zdrowia wskazała na potrzebę stworzenia nowej kategorii wśród pacjentów z atypową postacią choroby (często dotyczącą jednego organu), u których przebieg mukowiscydozy nie musi być manifestowany dysfunkcją błonowego kanału chlorkowego (test potowy) oraz obecnością dwóch mutacji genu odpowiedzialnego za jego syntezę. Niniejsza praca ma na celu zwrócić uwagę na trudności w rozpoznaniu mukowiscydozy u pacjentów, którzy nie spełniają kryteriów diagnostycznych tej choroby – tzw. złotych standardów. Dzieci z atypową postacią mukowiscydozy mogą wykazywać dysfunkcję tylko jednego narządu danego układu, i to w stopniu znacznie łagodniejszym niż u pacjentów z typową postacią mukowiscydozy, co może stanowić główną przyczynę niepowodzeń diagnostycznych i terapeutycznych.

Słowa kluczowe: mukowiscydoza, atypowa postać mukowiscydozy, diagnostyka, CFTR, genetyka

Abstract

The diagnosis of cystic fibrosis is based on the occurrence of clinical symptoms and evidence of two mutations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. However, in cases of atypical cystic fibrosis, not all symptoms may be manifested and not all diagnostic tests may be positive. The World Health Organization has recognised the need for a category that covers patients with atypical (often single organ disease), who may or may not supply evidence for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction (sweat test) or two cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations. The aim of this case report is to highlight the difficulties in cystic fibrosis diagnosis in some groups of patients who do not fit in the “gold standard” of the diagnostic scheme. Individuals with atypical cystic fibrosis might only have dysfunction in one organ system and of a much milder degree than those with typical cystic fibrosis. This may be the main reason for a diagnosis and treatment delay.

Key words: cystic fibrosis, atypical cystic fibrosis, diagnostics, CFTR, genetics

Skróty:

IgG – immunoglobulina G
 IgM – immunoglobulina M
 CF – mukowiscydoza (*cystic fibrosis*)
 CFTR – błonowy regulator przewodnictwa (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

WSTĘP

Brak właściwego rozpoznania u pacjenta z mukowiscydozą może prowadzić do opóźnienia jego efektywnego leczenia. Dzieci z atypową postacią mukowiscydozy mogą wykazywać dysfunkcję tylko jednego narządu danego układu, i to w stopniu znacznie łagodniejszym niż u osób z typową postacią tej choroby. Chorzy z atypowymi objawami mukowiscydozy stanowią wyzwanie diagnostyczne dla klinicystów, a brak właściwej diagnozy i efektywnego leczenia może znacząco zwiększyć liczbę groźnych powikłań⁽¹⁾. Najpoważniejszym problemem są zaburzenia oddychania, które mogą skutkować nawracającymi zapaleniami płuc. Występują także inne objawy, takie jak: zapalenie zatok, przewlekły ból głowy, niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki, polipy nosa, niski wzrost czy bezpłodność. W pracy przedstawiono przypadek pojedynczej mutacji genu kodującego białko CFTR (*CFTR*) u dziecka z objawami nawrotowego zapalenia krtani, obturacyjnego zapalenia oskrzeli oraz z nawracającymi infekcjami dolnych dróg oddechowych.

OPIS PACJENTA

Czternastoletni chłopiec został przyjęty do kliniki z powodu przewlekłego kaszlu, trzech epizodów utraty przytomności w wywiadzie oraz szybkiego męczenia się po wysiłku fizycznym. W przeszłości wielokrotnie hospitalizowany z powodu nawracających infekcji układu oddechowego (zawsze wymagających antybiotykoterapii), ostrych zapaleń krtani oraz obturacyjnych zapaleń oskrzeli. Pacjent pozostawał również pod opieką poradni alergologicznej, hematologicznej i laryngologicznej. Po raz pierwszy hospitalizowany w 2000 roku z powodu zapalenia krtani oraz niewydolności oddechowej, następnie czterokrotnie w 2002 roku z powodu ostrego zapalenia krtani, śródmiąższowego zapalenia płuc, obturacyjnego zapalenia oskrzeli – leczony wieloma antybiotykami z niewielką poprawą. Dodatni wywiad rodzinny w kierunku mukowiscydozy (kuzynostwo z rozpoznaną mukowiscydozą) oraz dwukrotnie nieprawidłowy wynik oznaczenia chlorków w pocie metodą konduktometryczną (80 mmol/l i 100 mmol/l; $N < 60$ mmol/l) skłoniły lekarzy w 2003 roku do przeprowadzenia testu genetycznego; analiza mutacji genu *CFTR* w oparciu o panel 20 najczęstszych mutacji w grupie etnicznej chłopca ujawniła pojedynczą mutację G54X. Rozpoznanie mukowiscydozy nie zostało potwierdzone, ale nie zostało też wykluczone.

W latach 2005–2010 pacjent był wielokrotnie hospitalizowany z powodu zapaleń krtani i zapaleń płuc. Rozpoznano

Abbreviations:

IgG – immunoglobulin G
 IgM – immunoglobulin M
 CF – cystic fibrosis
 CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

INTRODUCTION

Failure to identify and label a patient with cystic fibrosis could lead to delays in effective therapies. Children with atypical cystic fibrosis might only have dysfunction in one organ system and of a much milder degree than those with typical cystic fibrosis. Patients with atypical symptoms of CF pose a diagnostic challenge to clinicians and can suffer substantial morbidity as a result of not receiving appropriate diagnosis and treatment⁽¹⁾. The most serious symptom is breathing difficulty, and it results in frequent lung infections. Other symptoms, such as sinus infections, chronic headaches, exocrine pancreatic insufficiency, nasal polyps, poor growth and infertility, can also be presented. We present a case with 1 CF-causing mutation characterised exclusively by severe laryngitis, obstructive bronchitis and recurrent lower respiratory tract infections.

PATIENT HISTORY

A 14-year-old boy was admitted to our clinic with chronic cough, history of three episodes of losing consciousness and shortness of breath during physical exercise. In the past, he was frequently hospitalised due to recurrent respiratory tract infections (always requiring antibiotic therapy), severe acute laryngitis and obstructive bronchitis. He also remained under supervision of an allergologist, haematologist and laryngologist. The boy was hospitalised for the first time in 2000 because of laryngitis and respiratory failure. Subsequently, he was hospitalised four times in 2002 due to the acute laryngitis, interstitial pneumonia and obstructive bronchitis. The boy was treated with multiple antibiotics with little effect. The positive family history of CF (cousin with diagnosed CF) and two incorrect test results of sweat chloride measured by a conductometric method (80 mmol/L and 100 mmol/L; $N < 60$ mmol/L) led doctors to perform a genetic test in 2003. The analysis for CF mutations using a routine panel of 20 common mutations for his ethnic origin showed a single G54X mutation. The diagnosis of cystic fibrosis was not confirmed, but also not excluded.

Between 2005 and 2010, the patient was hospitalised many times because of inflammatory respiratory diseases – laryngitis and pneumonias. He was also diagnosed with adenoid hypertrophy (adenotomy was not performed due to abnormal coagulation parameters: APTT 62.1 sec., INR 2.50, factors: VIII 58.8%, IX 46.9%, XI 53.7%, XII 67.8%). Due to the family history of celiac disease (sister

przerost migdałka gardłowego, jednak zabieg adenotomii nie został przeprowadzony ze względu na nieprawidłowe parametry krzepnięcia (APTT 62,1 s, INR 2,50, czynnik: VIII 58,8%, IX 46,9%, XI 53,7%, XII 67,8%). Z uwagi na dodatni wywiad rodzinny w kierunku celiakii (siostra z rozpoznaną celiakią) chłopiec był diagnozowany pod kątem nietolerancji glutenu. Wykonano testy genetyczne, które ujawniły obecność genu *HLA-DQ2*. Negatywny wynik testów serologicznych (poziom przeciwciał przeciwko transglutaminazie tkankowej 0,17 g/l; $N < 0,99$ g/l) oraz prawidłowy wynik badania histopatologicznego kosmków jelita cienkiego nie potwierdziły rozpoznania celiakii.

Przy przyjęciu do kliniki stan ogólny dość dobry. Chłopiec skarżył się na przewlekły, produktywny kaszel oraz gorszą tolerancję wysiłku fizycznego pod postacią duszności. W badaniu fizykalnym stwierdzono niestaje rżenia nad polami płucnymi oraz szmer nad sercem. Wyniki badań laboratoryjnych wykazały prawidłowe parametry układu krzepnięcia, układu dopełniacza oraz prawidłowy poziom alfa1-antytrypsyny. Miana przeciwciał, oznaczone w klasie IgM oraz IgG, przeciwko cytomegalowirusowi, wirusowi opryszczki, wirusowi Epsteina–Barr, zakażeniu *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Toxocara canis* i *Toxoplasma gondii* były prawidłowe. Stężenie elastazy w kale wynosiło 500 µg/g ($N < 200$ µg/g). Całkowite stężenie immunoglobuliny G było podwyższone (17,7 g/l; $N < 17,1$ g/l), głównie w klasach IgG1 i IgG2 (IgG1 = 1250,0 mg/dl; $N = 400,0–1150,0$ mg/dl; IgG2 = 933,0 mg/dl; $N = 98,0–480,0$ mg/dl). Dwukrotnie oznaczono poziom chlorków w pocie, który był podwyższony i wyniósł 69 mmol/l oraz 73 mmol/l ($N < 60$ mmol/l). Badanie bakteriologiczne płwociny było negatywne. Badania czynnościowe układu oddechowego oraz próba rozkurczowa z salbutamolem (400 µg) (przeprowadzone zgodnie z wytycznymi Amerykańskiego Towarzystwa Pulmonologicznego⁽²⁾): FEV1 = 88% wn., FEV1/FVC = 96%, próba rozkurczowa – ujemna, TLC = 64% wn., sRaw = 333% wn., Rint = 110% wn. Próba prowokacyjna z metacholiną była dodatnia (PC20M = 2,6 mg/ml). Dziecko diagnozowano w kierunku alergii: stężenie IgE całkowitej, stężenia swoistych IgE dla alergenów środowiskowych – prawidłowe, punktowe testy skórne z alergenami środowiska – ujemne. Rozpoznanie astmy zostało wykluczone. Zdjęcie radiologiczne klatki piersiowej uwidocznilo zmiany zapalne w płucach, bez radiologicznych cech CF. Badanie obrazowe klatki piersiowej metodą tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości (*high-resolution computed tomography*, HRCT) nie uwidocznilo zmian charakterystycznych dla mukowiscydozy. Wynik próby tuberkulinowej był ujemny. Pierwotna dyskineza rzęsek została wykluczona (test sacharynowy). W związku z obecnością szmeru nad sercem oraz występującymi w przeszłości epizodami utraty przytomności wykonano badanie echokardiograficzne, które wykazało dysplazję zastawki aorty z łagodną niedomykalnością i poszerzeniem aorty wstępującej oraz struny rzekome w lewej komorze. Badanie EKG metodą Holtera nie wykazało

diagnozowanego z celiakią), the patient was examined towards gluten celiac sprue. On genetic testing, the presence of *HLA-DQ2* was found. On the basis of negative results of serological tests (level of antibodies against transglutaminase tissue 0.17 g/L; $N < 0.99$ g/L) and normal histopathology result of small intestine villas, the diagnosis of celiac disease was not confirmed.

The patient was admitted to our department in a fairly good general condition. He suffered from long-lasting productive cough and exercise intolerance connected with dyspnoea. The physical examination revealed non-permanent rhonchi above the lung fields and heart murmur. Laboratory tests resulted in correct parameters of the coagulation system, the complement system, and alpha-1 antitrypsin. Antibody titres of cytomegalovirus, herpes simplex virus, Epstein–Barr virus, mycoplasma, chlamydia, borrelia, toxocara and toxoplasma evaluated in the IgM and IgG class were normal. Faecal elastase was 500 µg/g ($N < 200$ µg/g). IgG levels were elevated (17.7 g/L; $N < 17.1$ g/L), with highly elevated IgG1 and IgG2 concentrations (IgG1 = 1,250.0 mg/dL; $N = 400.0–1,150.0$ mg/dL; IgG2 = 933.0 mg/dL; $N = 98.0–480.0$ mg/dL). Sweat chloride values were re-examined twice and occurred to be elevated – 69 mmol/L and 73 mmol/L ($N < 60$ mmol/L). The bacteriological sputum examination was negative. Pulmonary function testing and reversibility test after the administration of salbutamol (400 µg), according to the American Thoracic Society guideline⁽²⁾, were performed; pre-bronchodilator FEV1 was 88% pred., FEV1/FVC = 96% pred., reversibility test was negative, TLC = 64% pred., sRaw = 333% pred., Rint = 110% pred. Bronchial hyperreactivity to metacholine (PC20M) was 2.6 mg/mL. The diagnosis of allergy was excluded by normal serum IgE, normal serum levels of specific IgE and skin prick tests to environmental allergens. Asthma was excluded. A chest X-ray revealed pneumonia, but no radiographic evidence for CF was observed. High-resolution chest CT was also performed – neither fibrosis nor CF-like changes were discovered. The Mantoux test was negative. Immobile cilia syndrome was excluded (by the negative result of saccharin test for nasal mucociliary clearance). Due to a murmur of the heart and several episodes of losing consciousness in the past, cardiac ECHO was performed, which resulted in diagnosing aortic valve dysplasia with mild aortic insufficiency and dilatation of the ascending aorta; false tendons in the left ventricle were also found. The standard Holter monitoring revealed no abnormal results. Because of the family heredity (mother has Graves–Basedow disease), periodical stomach aches and low weight and height (25th percentile, BMI 17.7), he was consulted by an endocrinologist, but no abnormalities were found. Based on the medical history, physical examination, laboratory tests, and specialist consultations the patient was diagnosed with atypical cystic fibrosis, aortic valve insufficiency, ascending aorta dilatation and chronic adenoiditis. This case of CF needs individualised treatment. Due to the

nieprawidłowości. Chłopiec był również diagnozowany endokrynologicznie z powodu dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku choroby Gravesa–Basedowa (choruje matka chłopca), okresowo pojawiających się bólów brzucha, niskiej masy ciała i wzrostu (25. percentyl, BMI 17,7) – nie wykazano odchyżeń od stanu prawidłowego. Na podstawie wywiadu, badania przedmiotowego, wyników badań laboratoryjnych oraz konsultacji specjalistycznych rozpoznano: atypową postać mukowiscydozy, niedomykalność zastawki aorty, poszerzenie aorty wstępującej oraz przewlekłe zapalenie migdałka gardłowego.

Chłopiec wymagał szindywidualizowanego leczenia. Ze względu na wywiad (duszność powysiłkowa, okresowe objawy obturacji) oraz nadreaktywność oskrzeli otrzymał glikokortykosteroidy wziewne i lek antyleukotrienowy. Okresowo konieczne były suplementacja enzymów trzustkowych oraz stosowanie dornazy alfa.

W leczeniu uwzględniono edukację pacjenta i rodziny dotyczącą postępowania w mukowiscydozie.

OMÓWIENIE

Diagnostyka mukowiscydozy opiera się na obecności dwóch mutacji genu odpowiedzialnego za syntezę błonowego kanału chlorkowego (*CFTR*). Choroba dotyczy w głównej mierze układu oddechowego i przewodu pokarmowego. Charakteryzuje się nieprawidłowym transportem jonów chlorkowych i sodowych przez błonę komórkową komórek nabłonka, prowadząc do powstania gęstej, lepkiej wydzieliny⁽³⁾. W atypowych postaciach mukowiscydozy nie wszystkie objawy ujawniają się we wczesnym dzieciństwie, a wyniki badań diagnostycznych nie zawsze potwierdzają chorobę. Światowa Organizacja Zdrowia wskazała na potrzebę określenia nowej kategorii wśród pacjentów z atypową postacią choroby (często dotyczącą jednego organu), w której nie wykazano dysfunkcji błonowego kanału chlorkowego (test potowy prawidłowy) oraz nie potwierdzono obecności dwóch mutacji genu *CFTR*⁽⁴⁾. Każdy test używany w diagnostyce CF zawiera tzw. strefę niepewności, która obejmuje nietypowe przypadki tej choroby. Znanych jest wiele czynników, które mogą mieć wpływ na zachowanie genu *CFTR*, takich jak geny modyfikujące czy czynniki środowiskowe^(2,5). Trudności w oddychaniu są najpoważniejszym objawem i skutkują uporczywymi infekcjami dróg oddechowych. Przedstawiany pacjent od wczesnego dzieciństwa ujawniał przewlekły, produktywny kaszel, nawracające zapalenia krtani oraz liczne infekcje układu oddechowego. Objawy żołądkowo-jelitowe prezentowane przez pacjenta nie były typowe dla mukowiscydozy. Nie potwierdzono rozpoznania CF w badaniu genetycznym, natomiast poziom chlorków w pocie był podwyższony.

Uważa się, że test potowy stanowi najbardziej wartościową procedurę diagnostyczną. Falszywe wyniki tego testu mogą być spowodowane kilkoma czynnikami: niemiarodajnymi metodami oznaczania albo błędami technicznymi lub interpretacyjnymi^(1,5). Mukowiscydoza jest rozpoznawana przy

medical history (post-exercise dyspnoea, periodic bronchial obstruction) and bronchial hyperreactivity, he received inhaled glucocorticosteroids and a leukotriene receptor antagonist. Periodically, the patient needed pancreatic enzymes and dornase alfa.

Proper education about CF of the child and of the parents was applied.

DISCUSSION

The diagnosis of cystic fibrosis (CF) is based on the occurrence of two mutations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*). This disorder most critically affects the lungs, but pancreas, liver, and intestine are often involved as well. The disease is characterised by abnormal transport of chloride and sodium across the epithelium, leading to thick, viscous secretions⁽³⁾. In cases of atypical CF, not all symptoms may be manifested in early childhood and not all diagnostic tests may be positive. The WHO has recognised the need for a category that covers patients with atypical (often single organ disease), who may or may not supply evidence for *CFTR* dysfunction (sweat test) or two *CFTR* mutations⁽⁴⁾. Each test used for CF diagnosis includes a grey zone of uncertainty where many of the atypical cases lie. It is now recognised that there are a lot of factors which can influence the behaviour of *CFTR* gene, such as special modifying genes or environmental factors. All this can influence the phenotype–genotype correlations^(2,5). Breathing difficulties are the most serious symptoms and result in persistent respiratory tract infections. Our patient has manifested chronic productive cough, recurrent laryngitis and multiple respiratory tract infections since his infancy, but gastrointestinal symptoms manifested by the patient were not typical of CF. There was no confirmation of CF in the pursued genetic tests, even though the sweat tests were positive.

The sweat test is considered to be the most valuable diagnostic procedure. Despite its importance in the diagnosis of CF, false sweat test results can occur. This is due to several factors, such as unreliable methods, technical or interpretational errors^(1,5). CF is diagnosed by an increased chloride concentration of more than 60 mmol/L on two or more occasions. Our case was diagnosed by the standardised chloride level and a single mutation in genetic tests. The most common mutation is F508del, and other common mutations in Poland are: G551D, W128X, G542X and N1303K⁽⁶⁾. Our patient manifested one mutation, but one of the most common – G54X. According to the European guidelines for CF diagnosis, individuals without or with 1 CF-causing mutation and clinical signs suggestive of *CFTR* dysfunction may be diagnosed with a *CFTR*-related disorder, depending on their clinical picture or family history, and are at risk for CF^(1,7). The presented patient was diagnosed with CF after 12 years of his medical history, and he is currently under the care of the Cystic Fibrosis Outpatient Clinic.

dwukrotnym wykazaniu wzrostu stężenia chlorków w pocie powyżej 60 mmol/l. Rozpoznanie CF u prezentowanego pacjenta potwierdzono wykonaniem wielokrotnie dodatnim testem potowym oraz wykazaniem obecności pojedynczej mutacji genu. Najczęstszą mutacją stanowi F508del; inne często występujące w Polsce mutacje to: G551D, W128X, G542X, N1303K⁽⁶⁾. U opisywanego chłopca ujawniła się pojedyncza mutacja G54X, również należąca do częstych w naszym regionie. Zgodnie z europejskimi wytycznymi dotyczącymi diagnostyki mukowiscydozy w przypadku osób prezentujących objawy kliniczne sugerujące mutację *CFTR*, u których nie wykazano mutacji genu lub wykazano jego pojedynczą mutację, można zdiagnozować chorobę *CFTR*-zależną, a ryzyko wystąpienia pełnoobjawowej mukowiscydozy jest u takich pacjentów wysokie^(1,7). U prezentowanego pacjenta po 12 latach obserwacji i diagnostyki rozpoznano mukowiscydozę i objęto go stałą opieką Poradni Leczenia Mukowiscydozy.

WNIOSKI

Celem pracy było podkreślenie konieczności interdyscyplinarnego podejścia lekarza do pacjenta. Brak ścisłej definicji atypowej mukowiscydozy sprawia, że rozpoznanie tej postaci choroby stanowi wyzwanie dla klinicystów i może prowadzić do braku właściwej diagnozy i prawidłowego leczenia. Dotychczas zostało poznanych ponad 1500 mutacji genu *CFTR* i określenie ich wszystkich jest niemożliwe. Typowe objawy oraz przynajmniej dwukrotnie oznaczony podwyższony poziom chlorków w pocie są wystarczające do rozpoznania mukowiscydozy i włączenia odpowiedniego leczenia.

Konflikt interesów

Autorki nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.

CONCLUSION

The aim of this case report was to underline the importance of an interdisciplinary attitude to patients that a doctor must have. The absence of a tight definition of CF and the lack of reliable genotype–phenotype correlation pose a diagnostic challenge to clinicians and can lead to substantial morbidity as a result of not receiving appropriate diagnosis and treatment. There are over 1.5 thousand mutations of the *CFTR* gene, and it is impossible to examine them all, especially nowadays when the number of “novel” mutations increases every several months. Typical symptoms and abnormal levels of chloride in at least two sweat tests are sufficient to diagnose cystic fibrosis and implement proper treatment.

Conflict of interest

The authors do not report any financial or personal links with other persons or organizations, which might affect negatively the content of this publication or claim authorship rights to this publication.

Piśmiennictwo / References

1. Wallis C: Atypical cystic fibrosis – diagnostic and management dilemmas. *J R Soc Med* 2003; 96 (Suppl 43): 2–10.
2. American Thoracic Society. Available from: www.thoracic.org.
3. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr *et al.*: Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 179–196.
4. WHO: The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Geneva 2002. Available from: www.who.int/genomics/publications/en/HGN_WB_04.02_TOC.pdf.
5. Hentschel J, Riesener G, Nelle H *et al.*: Homozygous *CFTR* mutation M348K in a boy with respiratory symptoms and failure to thrive. Disease-causing mutation or benign alteration? *Eur J Pediatr* 2012; 171: 1039–1046.
6. CF Mutation Database. Available from: www.genet.sickkids.on.ca.
7. Castellani C, Macek M Jr, Cassiman JJ *et al.*: Benchmarks for cystic fibrosis carrier screening: a European consensus document. *J Cyst Fibros* 2010; 9: 165–178.