

11237
154
200



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES
HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CURSO DE ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA MEDICA

Valoración Semicuantitativa de Grasa Fecal con la Prueba del Esteatocrito en Pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas.

TESIS RECEPCIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN PEDIATRIA MEDICA
P R E S E N T A

DRA. ALEJANDRA DE LA TORRE AZUARA

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

DRA. SOLANGE HELLER ROUSSANT

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1993





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
TITULO	1
OBJETIVO	2
ANTECEDENTES CIENTIFICOS	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ...	8
HIPOTESIS	9
DEFINICION DE VARIABLES	10
DISEÑO DEL ESTUDIO	11
MATERIAL Y METODO	12
ANALISIS ESTADISTICO	17
CONSIDERACIONES ETICAS	18
RESULTADOS.....	19
DISCUSION	27
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFIA	30

**VALORACION SEMICUANTITATIVA DE GRASA FECAL CON LA PRUEBA
DEL ESTEATOCRITO EN PACIENTES CON FIBROSIS
QUISTICA DEL PANCREAS**

OBJETIVO

Valorar el esteatocrito como una prueba semicuantitativa de grasa fecal en pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas y normales.

ANTECEDENTES CIENTIFICOS

La Fibrosis Quística del Páncreas o Mucoviscidosis es una enfermedad hereditaria, compleja, autosómica recesiva, con una incidencia reportada en los Estados Unidos de Norteamérica de 1:2000 nacidos vivos y variables en diferentes grupos étnicos y áreas geográficas. En México no se conoce la frecuencia del padecimiento (1-4).

La Fibrosis Quística del Páncreas es una enfermedad multisistémica, en la cual la disfunción de las glándulas exócrinas parece ser el principal mecanismo patogénico y responsable de muchas manifestaciones clínicas y complicaciones que se presentan (5).

En los últimos años, los avances en genética molecular han permitido llegar a localizar el gen de la Fibrosis Quística del Páncreas en el brazo del cromosoma 7(7q31.3) y posteriormente, aislamientos mediante estrategias de clonación molecular (6-7). La principal mutación que causa el padecimiento se ha definido en el nivel de secuencias de DNA y puede tener efectos importantes en el consejo genético y en el diagnóstico prenatal. Las manifestaciones clínicas, severidad y velocidad de progresión del padecimiento son muy variables, la penetrancia puede dar como resultado diferentes mutaciones en el locus de la Fibrosis Quística (7-12).

Las manifestaciones clínicas del padecimiento se pueden dividir en varios grupos:

I. a) Alteraciones en la función pancreática:

La mayor parte de los pacientes (85%) presentan insuficiencia pancreática exócrina, con alteración en la absorción de grasas, lo cual da como principal manifestación la excreción aumentada de grasas referida como esteatorrea (13), el perfil de lípidos alterados (14-15), así como una deficiencia en vitaminas liposolubles A,D,E,K (16,17). El grupo restante de los pacientes no manifiestan insuficiencia pancreática exócrina (7,18,19).

b) Ileo Meconial:

Este se presenta en la etapa neonatal en un 5% a 10% de los recién nacidos vivos. Puede evolucionar a vólvulos, se ha descrito inclusive perforación in útero; al ileo se asocia con peritonitis meconial y la posibilidad de desarrollar calcificaciones peritoneales. En Estados Unidos de Norteamérica se ha reportado que del 20 al 25% de todos los pacientes que han presentado obstrucción intestinal en etapa de recién nacido corresponden a pacientes en quienes se diagnosticó Fibrosis Quística del Páncreas (1,7,20).

A la obstrucción del intestino delgado o colon en los niños después del periodo neonatal, se le considera como "equivalente de íleo meconial" (1,7,20).

c) Como enfermedad hepato-biliar:

Se puede presentar cirrosis biliar focal, en el 25% a 30% de los pacientes y cirrosis multilobular en el 2%.

Se han reportado también mayor frecuencia de Colelitiasis en estos pacientes que en la población en general (1,7,21,22).

II. A nivel del Aparato Respiratorio:

Se alteran las funciones de secreción y excreción de secreciones naturales, lo cual lleva serios trastornos que se manifiestan por: tos crónica, procesos infecciosos repetitivos en especial por gérmenes oportunistas que provocan patología pulmonar crónica obstructiva con serias repercusiones sobre el crecimiento y desarrollo normal y que de acuerdo a su evolución marcan la historia natural de la enfermedad (23,24,25).

El diagnóstico de Fibrosis Quística del Páncreas se fundamenta en la historia familiar, manifestaciones típicas gastrointestinales y/o pulmonares y al realizar cuantificación de electrolitos en sudor y obtener cifras de más de 60mEq de cloro.

En la valoración de la función gastrointestinal, se han empleado estudios para detectar la insuficiencia pancreática tales como:

1. Determinación cualitativa de grasas en heces en fresco con tinción de Sudán, lo cual requiere colorante, que es el rojo Sudán (26).
2. Cuantificación de grasas en heces recolectadas durante 72 horas, donde es necesaria la campana de extracción de gases (26).

3. Cuantificación de enzimas pancreáticas a nivel duodenal, la cual requiere de equipos especiales para medición de amilasa, lipasa y bicarbonato a nivel duodenal, lo cual no está disponible en muchos centros hospitalarios (27,28).

Desde hace muchos años (1975), Phuapradit (28) estandariza en niños recién nacidos una prueba semicuantitativa para grasas en heces; establece la recolección de evacuaciones en 24 horas, empleando diferentes fórmulas lácteas como base de la alimentación; la técnica requiere de aproximadamente 30 minutos para su completo procesamiento y de implementos sencillos como son una centrifuga, agua, arena fina, tubo capilar heparinizado y una mínima cantidad de heces (0.5g); mientras que otras técnicas como la de Sobel requieren de 3 gramos de materia fecal.

El esteatocrito o prueba semicuantitativa de grasas en heces, se realiza por medio de la identificación en un tubo capilar de una parte basal que es la fase sólida, una fase intermedia que corresponde al contenido de agua y una última fase que corresponde al nivel de grasa.

En mediciones consecutivas de esteatocrito en el mismo especimen, se reporta un coeficiente de variación que va del 2 al 12%; en el estudio se observa que los niños que presentan un valor de esteatocrito mayor, manifiestan cierto grado de mala absorción de grasas,

Posteriormente Colombo (29) utiliza esta prueba en pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas para monitoreo de excreción de grasas en heces y la adecuada dosificación de enzimas pancreáticas.

Iacono y colaboradores (30,31) realizan esta prueba en lactantes sanos en los tres primeros meses de vida, logrando una correlación entre contenido fecal de grasas y el valor del esteatocrito, describiendo que el lactante menor presenta esteatorrea desde el 7 al 28 días de vida, la cual va disminuyendo y en aquellos casos que continúan con esteatocrito mayor de 2% deben mantenerse en observación estrecha.

Walters en 1990 (32), mide la severidad de la esteatorrea en 100 pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas, utilizando una prueba química con microscopio de la cual reporta una sensibilidad alta comparada con la prueba del esteatocrito la cual en sus manos no revela los resultados satisfactorios obtenidos por los autores antes mencionados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas presentan mala absorción de grasas como manifestación de insuficiencia pancreática exócrina, la cual puede establecerse por pruebas de laboratorio, como lo es la cuantificación de enzimas pancreáticas a nivel duodenal, la excreción de grasas en heces en recolección de 72 horas; ambas pruebas requieren para su realización de recursos sofisticados que no se cuentan en todos los medios hospitalarios.

Se ha reportado la utilidad de la prueba del esteatocrito, expresada en porcentaje, para determinar grasas en heces:

En el servicio de Gastroenterología Pediátrica y en la Clínica de Fibrosis Quística del Páncreas, no contamos con una prueba para valorar la esteatorrea, por lo que consideramos conveniente la determinación de grasas en heces mediante esta técnica ya que es fácil, rápida y sencilla como lo reportan los diversos autores, además de confirmar el diagnóstico de insuficiencia pancreática exócrina y en forma indirecta nos podría ser de utilidad para la dosificación de las enzimas pancreáticas en la fase de tratamiento.

HIPOTESIS**HIPOTESIS ALTERNA (H1):**

El porcentaje (%) del esteatocrito es mayor en pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas que en pacientes sanos.

HIPOTESIS NULA (H0):

El porcentaje (%) del esteatocrito es igual en pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas que en pacientes sanos.

DEFINICION DE VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas.

Niños sanos.

VARIABLE INDEPENDIENTE:

Medición semicuantitativa de grasa en heces por medio del esteatocrito.

El esteatocrito se expresa en porcentaje y se obtiene de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Esteatocrito (\%)} = F/(F+S) \times 100$$

F = Capa grasa.

S = Capa basal.

Se considera prueba positiva para esteatorrea con valores por arriba de 2% y negativa valores por debajo de 2% .

DISEÑO DEL ESTUDIO

**PROSPECTIVO, LONGITUDINAL, COMPARATIVO, OBSERVACIONAL
ESTUDIO DE UNA COHORTE**

MATERIAL Y METODO

UNIVERSO DE TRABAJO:

El estudio se realizó en todos los pacientes con diagnóstico de Fibrosis Quística del Páncreas que se manejan en el servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital General Centro Médico la Raza y que reunieron los criterios de inclusión.

Se formó un grupo control con un mismo número de niños sanos.

CRITERIOS DE INCLUSION:

1. Se incluyeron pacientes pediátricos de 0 a 16 años con diagnóstico de Fibrosis Quística del Páncreas, establecido por más de dos pruebas positivas de cloruros en sudor.
2. Que recibían manejo sustitutivo con enzimas pancreáticas.
3. Que no cursaban con enfermedades concomitantes que produzcan síndrome de mala absorción.
4. Que aceptaron ser incluidos en el protocolo de estudio.

CRITERIOS DE NO INCLUSION:

1. Aquellos pacientes que no cumplieron con los criterios de inclusión.
2. Pacientes que por otras causas cursaban con esteatorrea.
3. Pacientes que no aceptaron ingresar al estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

1. Aquellos pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas que al suspender el manejo sustitutivo de enzimas pancreáticas presentaron despeñe enteral importante.
2. Pacientes que no llevaron de manera adecuada la dieta necesaria para realizar la prueba del esteatocrito.
3. Pacientes en los que no se pudo recolectar adecuadamente la muestra fecal.
4. Pacientes que decidieron abandonar el tratamiento.

METODOLOGIA

I. Se formaron 2 grupos de niños:

- a) Pacientes pediátricos con Fibrosis Quística del Páncreas.
- b) Niños sin patología digestiva.

II. Se anotaron en hoja especialmente diseñada los datos de los pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas que cumplieron los criterios de inclusión.

III. Se informó a cada paciente y familiar sobre la técnica y finalidad del estudio para lograr una mayor colaboración de ambas partes.

SECUENCIA DE EVENTOS:

Día 0: Se toma muestra inicial de heces a los pacientes con Fibrosis Quística manejados con enzimas pancreáticas.

Día 1: Se le indicó a cada paciente suspender las enzimas pancreáticas.

Día 2 y 3: A cada niño de ambos grupos se le indicó dieta fija en grasas por 48 horas. Este tipo de dieta a base de triglicéridos de cadena larga, media y poli-insaturados, se administró de la siguiente manera:

- 25 gramos de grasa al día en lactantes.
- 50 gramos de grasa al día en preescolares.
- 100 gramos de grasa al día en escolares.

Día 4: El paciente se presentó al servicio de Gastroenterología Pediátrica con una muestra de la evacuación más reciente de las últimas 12 horas para realizar el esteatocrito.

La prueba del esteatocrito se realizó en el servicio de gastroenterología Pediátrica de acuerdo a la técnica siguiente:

- a) Se tomó 500mg de heces frescas.
- b) Se homogenizó en un mortero con 60mg de arena fina y dos volúmenes de agua (2.5ml).
- c) La suspensión se llevó a un tubo capilar heparinizado para hematócrito, pues su longitud es la medida estandar requerida.
- d) El capilar se selló con flama por un solo lado.
- e) Se centrifugó durante 15 minutos a 12000 revoluciones por minuto, empleando microcentrífuga.
- f) Posteriormente a la centrifugación se retiró el capilar y se colocó en posición vertical.
- g) Se identificó las siguientes capas: en la parte basal, parte de la evacuación y la arena; la parte intermedia corresponde al agua y la última fase corresponde a la grasa.
- h) Esta prueba se realizó por duplicado para evitar la posibilidad de error técnico.

i) Se empleó para la medición de las fases, un instrumento semejante al vernier con medidas mínimas de 0.05mm y el contenido de grasa se expresó como porcentaje total de la extensión de la fase sólida.

j) Se empleó para el cálculo del porcentaje de esteatocrito, la siguiente fórmula:

$$\text{Esteatocrito (\%)} = F/(F+S) \times 100$$

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se reportan con frecuencia, porcentaje, media y desviación estandar.

Los resultados de la prueba del esteatocrito entre ambos grupos se comparó por medio de la prueba de probabilidad exacta de Fisher.

CONSIDERACIONES ETICAS

Se solicitó autorización por escrito a los familiares para la inclusión y realización del estudio, basándose en los principios de Helsinki, Tokio, Hong Kong y el Artículo V de la Ley de Salud.

RESULTADOS

El estudio se realizó en el servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital General Centro Médico la Raza que participa en la Clínica de Fibrosis Quística del Páncreas. Actualmente dentro de la Clínica se controlan 34 pacientes de los cuales 38.2% corresponden al sexo femenino y el 61.7% al sexo masculino.

De los 34 pacientes, 17 cubrieron los criterios de inclusión para entrar al estudio. Los 17 pacientes tenían antecedentes de una o más manifestaciones clínicas de la enfermedad. En todos los casos el diagnóstico se realizó por niveles elevados de cloro en sudor.

De los 17 pacientes 7 (41.1%) correspondió al sexo femenino y 10 (58.8%) al sexo masculino. (Gráfica 1)

El promedio de edad para el grupo estudiado fue de 9.2 años con una desviación estandar de 3.4 . (Gráfica 2)

La media de edad para sexo masculino fue de 11.4 años con una desviación estandar de 2.7 y para el sexo femenino de 6.2 con una desviación estandar de 1.8 . (Gráfica 3)

El grupo control se constituyó por 17 pacientes sanos que fueron tomados en población extrahospitalaria en forma aleatoria. De estos sujetos 8 (47.0%) correspondió al sexo femenino y 9 (52.9%) al sexo masculino. (Gráfica 4)

El promedio de edad del grupo control es de 7.1 años con una desviación estandar de 2.6 . (Gráfica 5)

Para el sexo femenino la edad media fue de 6.5 años con una desviación estandar de 1.6 y para el sexo masculino de 7.6 con una desviación estandar de 3.3 . (Gráfica 6)

Todos los pacientes con Fibrosis Quística se encontraban con tratamiento sustitutivo de enzimas pancreáticas al momento del estudio y ninguno de ellos presentaba esteatorrea.

La prueba de esteatocrito realizada al inicio del estudio y bajo su tratamiento habitual fue negativa en los 17 casos.

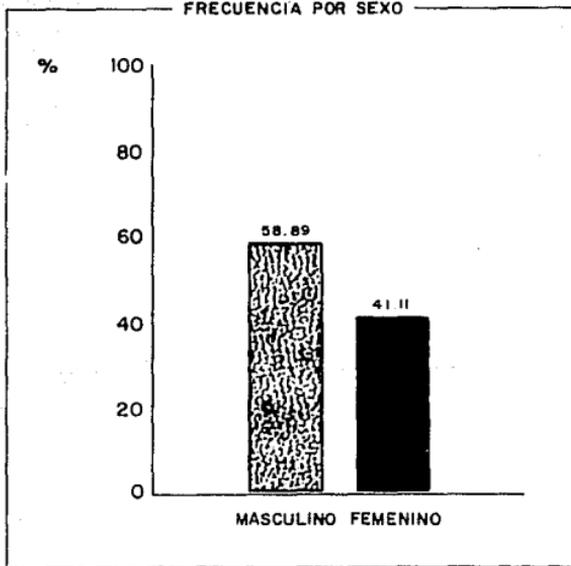
Todos los pacientes se sometieron a la suspensión del medicamento por los 3 días previstos y la dieta rica en grasas mencionada en la metodología por 2 días.

La segunda prueba del esteatocrito se realizó en todos los pacientes al siguiente día de terminar la dieta. En 16 (94.1%) la prueba resultó negativa y en 1 (5.8%) se encontró positivo con 3.5% de esteatocrito.

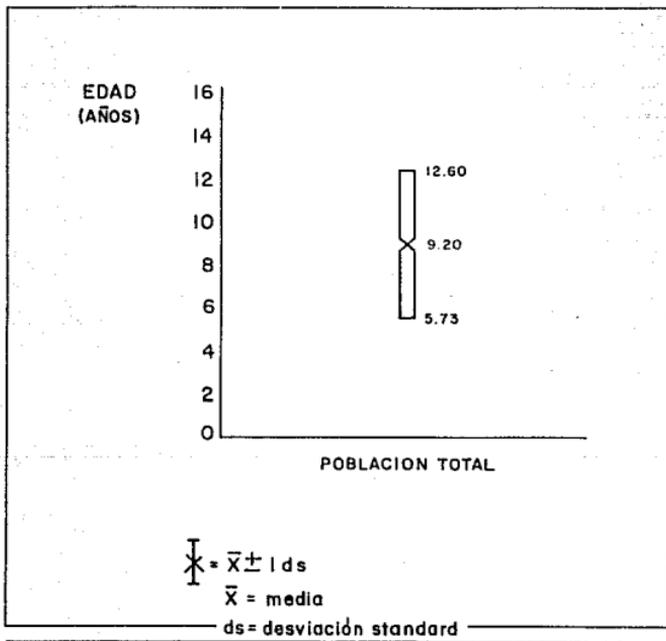
En los 17 sujetos del grupo control la prueba del esteatocrito fue negativa.

Al comparar los resultados del esteatocrito en ambos grupos no se encuentra diferencia estadística significativa.

GRAFICA I

PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA
FRECUENCIA POR SEXO

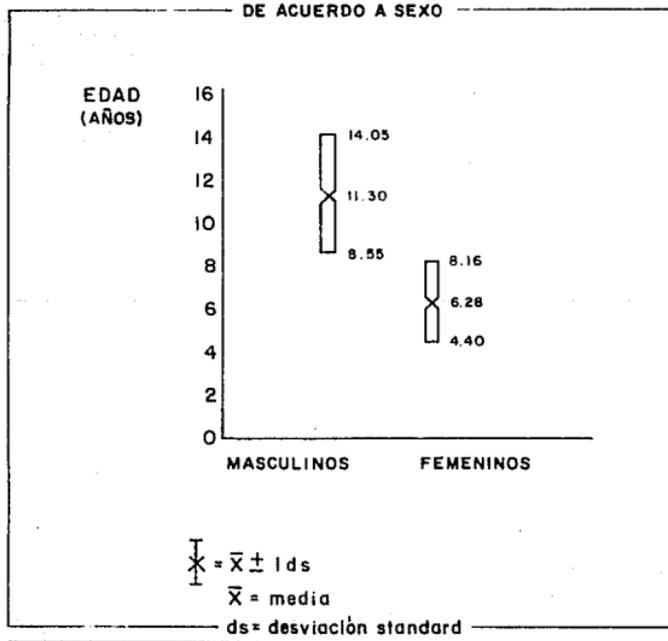
GRAFICA 2
PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA



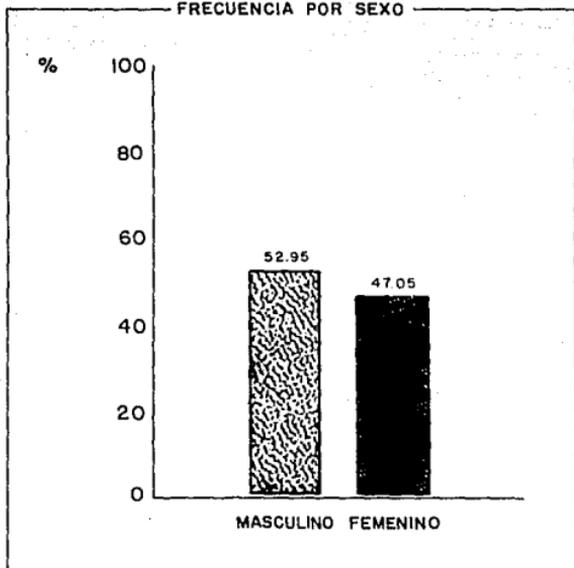
GRAFICA 3

PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA

DE ACUERDO A SEXO

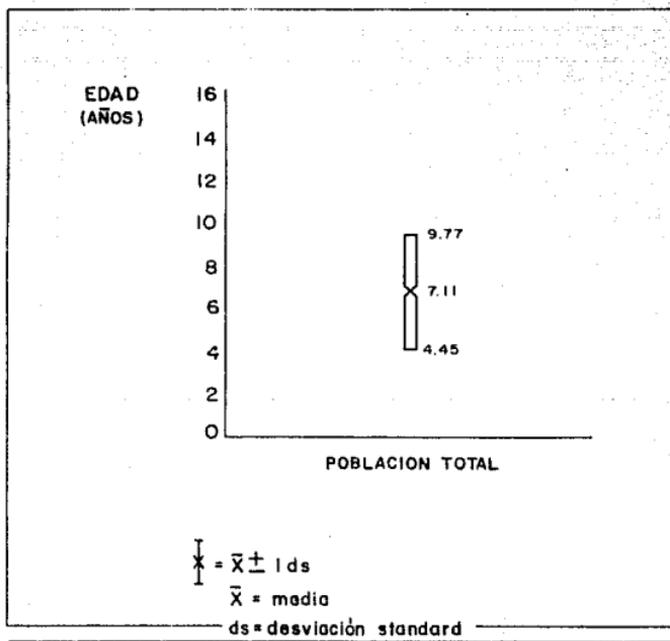


GRAFICA 4

GRUPO CONTROL
FRECUENCIA POR SEXO

GRAFICA 5

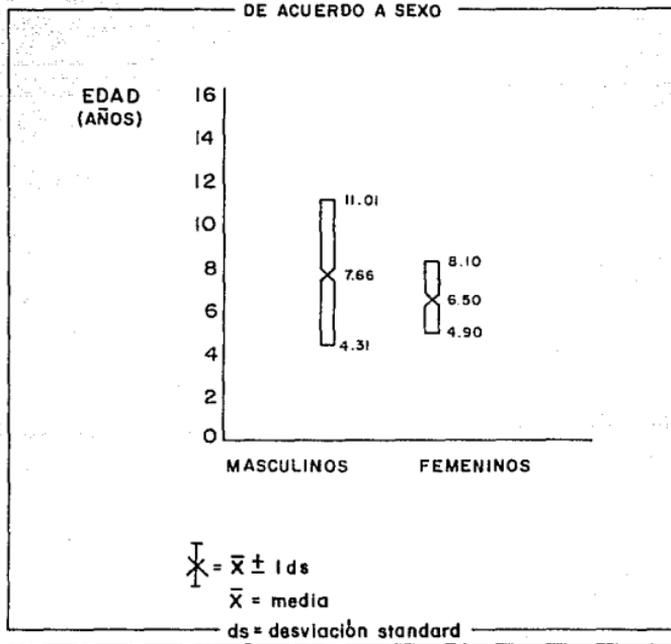
GRUPO CONTROL



GRAFICA 6

GRUPO CONTROL

DE ACUERDO A SEXO



DISCUSION

En los últimos años se ha incrementado el estudio de los pacientes con Fibrosis Quística. Debido a que existe mala absorción de grasas en casi todos estos pacientes, diversos autores han realizado métodos alternativos para la estimación de esteatorrea, como es la prueba del esteatocrito estandarizada por Phuapradit en 1981 y realizada en recién nacidos, definiendo en sus resultados el porcentaje de positividad para la misma. (28)

En el año de 1987 Colombo obtiene resultados satisfactorios al utilizar la prueba del esteatocrito en 74 pacientes con Fibrosis Quística, refiriendo un coeficiente de excreción de más del 25%, además cuantifica la disminución del mismo al administrar enzimas pancreáticas y así ajusta el manejo en dichos pacientes (29). Dos años más tarde Iacono presenta un estudio para establecer los rangos normales de esteatocrito en los primeros tres meses de vida, observando una excelente correlación entre los valores del esteatocrito y el contenido de grasa fecal. En 1991 realiza la prueba del esteatocrito para detectar mala absorción en pacientes con enfermedad celiaca y compara sus resultados con biopsia intestinal, absorción de D xilosa y triglicéridos en suero, nuevamente obtiene éxito en la prueba. (30,31)

Guariano en 1992 reporta un estudio de 4 años de

duración en el que realiza la prueba a 1,189 niños y la compara con la determinación de grasas en heces de 72 horas (prueba de Van de Kamer) siendo los dos métodos significativos en su correlación. (34)

Walters estudia 100 pacientes con Fibrosis Quística del Páncreas y no obtiene resultados fidedignos con el método del esteatocrito, por lo que lo considera de poca utilidad en la practica clínica (32). Sin embargo Brown y Booth lo critican ya que señalan que la técnica de homogenización es crucial y consideran que es necesario utilizar un homogenizador de tolerancia fina de Potter-Elvehjem y una mayor cantidad de agua que la usada por Phuapradit y colegas. (33)

En nuestro estudio al igual que Walters no pudimos reproducir los resultados de otros autores, considerando que los factores determinantes para obtener resultados negativos son:

- a) Dificultad en la técnica para una separación clara de la capa grasa, líquida y sólida despues de la centrifugación.
- b) Una homogenización inadecuada de las heces como lo mencionan Brown y Booth.
- c) La cantidad de agua utilizada en la mezcla de heces puede ser insuficiente en nuestra técnica.
- d) Variabilidad en el diámetro interno y longitud del tubo capilar.

CONCLUSIONES

1. De acuerdo a nuestro estudio el esteatocrito no es un método adecuado para determinar esteatorrea ya que no logramos reproducir los resultados positivos reportados por algunos autores.
2. Se debe continuar tratando de estandarizar la técnica del esteatocrito para establecer su verdadera utilidad en la práctica clínica.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFIA

1. Lloyd SJ. Cystic fibrosis in textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy. 2d. Ed. New York; Raven Press 1989: 831-876.
2. Silverman A. Cystic fibrosis in Pediatric Clinical Gastroenterology. 2d. Ed. St Louis; Mosby Company 1983: 814-820.
3. Anderson MC. Cystic fibrosis in: Gastroenterology and Nutritional Aspect. 2d. Ed. Melbourne; Blackwell Scientific Publ 1987: 505-520.
4. Gryboski G. The exocrine pancreas in: Gastrointestinal Problems in the Infancy. 1st. Ed. New York 1985: 389-390.
5. Park WR, Grand JR. Gastrointestinal manifestation of cystic fibrosis: A review. Gastroenterology 1981; 81:726.
6. Davis BP, Di Sant Agnes AP. Cystic fibrosis at forty - quo Vadis. *Pediatr Res* 1980; 14: 83-87.
7. Tizzano EF, Buchwald M. Cystic fibrosis: beyond the geneto therapy. *J Pediatr* 1992; 120: 337-349.
8. Waters DC, Dorney SF. Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in neonatal screening program. *N Engl J Med* 1990; 32: 303-308.
9. Gureshi AR, Punnet HH. Carrier detection in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1985; 106: 913-916.

10. Lang S, Schwartz M. Endocrine and exocrine and pancreas function and the delta F508 mutation in the cystic fibrosis. *Clin Genet* 1990; 40: 345-348.
11. Torok D, Toth Z. Ultrasound diagnosis and screening of fetal cystic fibrosis. *Act Univ Carol Med Praha* 1990; 36: 139-141.
12. Szabo N, Teichmann F. Genetic counselling and prenatal diagnosis of cystic fibrosis by microbilliar enzyme assay from amniotic fluid. *Act Univ Carol Med Praha*. 1990; 36: 132-134.
13. Lamers CB, Jensen JB, Hafkeenscheil JC. Evaluation of test of exocrine and endocrine pancreatic function in older patient with cystic fibrosis. *Pancreas* 1990; 5: 65-69.
14. Gaskin JK, Durie RP. Colipase and lipase secretion in childhood onset pancreatic insufficiency. *Gastroentr* 1984; 86: 1-7.
15. Hildebran H, Borgstrom B. Isolate colipase deficiency in two brothers. *Gut* 1982; 23: 243-246.
16. Sokol RJ, Readon MC, Accurso FJ. Fat soluble vitamin status during the first year of life in infants with cystic fibrosis identified by screening of new borns. *Am J Nutr* 1989; 50: 1064-1071.
17. Bang BJ, Thorsgard WP. Short report: lipid and vitamin B12 malassimilation in pancreatic insufficiency. *Aliment Pharmacol Ther* 1991; 5: 207-210.

18. Varga G, Reilderberger RP. Effect of potent bombesin antagonist on exocrine pancreatic secretion in rats. *Peptides* 1991; 12: 493-497.
19. Levy E . Lepage G, Bandayan M. Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patient. *J Lipid Res* 1989; 30: 1197-1209.
20. Maurage G. Meconium ileus and its equivalent as risk factor for development of cirrhosis: an autopsy study in cystic fibrosis. *J Ped Gastr and Nutr* 1989; 1: 21.
21. Bell JA, Biltonen RL. Attraction of phospholipase A2 on lipid bilayers. *Methods Enzymol* 1991; 197: 249-250.
22. Robinson PJ, Smith AL, Sly PD. Duodenal pH in cystic fibrosis and its relationship to fat malabsorption. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 1299-1304.
23. Ernst BJ. Microbial lung infections new therapeutic strategies. *Pathol Biol Paris* 1991; 39: 587-591.
24. Wevers M. Pathogenesis of emphysema: assesment of basic science concept through clinical investigation. *Chest* 1989; 95: 190-195.
25. Siter S. The imbalance between granulocyte neutral proteases and antiproteases in bronchial secretions from patients with cystic fibrosis. *Antibiot Chemother* 1989; 42: 158-168.

26. Van De Kamer JH, Jutuinlein BT. Rapid method for determination of fatin heces. J Biol Chem 1949; 177: 347-355.
27. Kelly OG, Sternby B. How protect human pancreatic activities in frozen duodenal juice. Gastroenterology 1991; 100: 189-195.
28. Phuapradit P, Narang A, Mendonca P. The steatocrit: a simple method for stimulation stool fat content in newborn infants. Arch Dis Child 1981; 56: 725-728.
29. Colombo P, Maiavacca R, Ronchi M. The steatocrit: a simple method for monitoring fat malabsortion in patients with cystic fibrosis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1987; 6: 926-930.
30. Iacono G, Carriocio A, Montalto G. Steatocrit test after a standard fatty meal: a new simple and sensitive test to detect malabsortion. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1991; 13: 61-67.
31. Iacono G, Carriocio A, Montalto G. Steatocrit test: normal range and physiological variations in infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1990; 11: 53-57.
32. Walters MP, Kelleher J, Gilbert J. Clinical monitoring of steatorrhoea in cystic fibrosis. Arch Dis Child 1990; 65: 99-102.
33. Brown GA, Booth IW. Clinical monitoring of steatorrhoea in cystic fibrosis. Arch Dis Child 1990; 65: 913.

34. Guariano A, Tarallo L, Greco L. Reference values of the steatocrit and its modifications in diarrheal diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14: 268-274.