

PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

LE MALATTIE POLMONARI PEDIATRICHE RARE 2.0

Le malformazioni polmonari
congenite

La Discinesia Ciliare Primaria

Le bronchiectasie non correlate alla
fibrosi cistica in età pediatrica

Le sindromi congenite
da ipo-ventilazione centrale

CFTR patie

Il Network Europeo per le
malattie polmonari rare (ERN-LUNG)



INDICE

Editoriale

Francesca Santamaria

Le malformazioni polmonari congenite

Federica Annunziata, Francesco Borgia, Francesco Raimondi, Silvia Montella, Marco Poeta, Francesca Santamaria

La Discinesia Ciliare Primaria

Nicola Ullmann, Lucia Lo Scalzo, Renato Cutrera

Le bronchiectasie non correlate alla fibrosi cistica in età pediatrica

Vittorio Romagnoli, Federica Zallocco, Alessandro Volpini, Salvatore Cazzato

Le sindromi congenite da ipo-ventilazione centrale

Valeria Caldarelli

CFTR patie

Elisabetta Bignamini, Federico Cresta, Barbara Messori, Irene Esposito, Antonella Lezo, Sara De Michelis, Elena Nave, Carlo Castellani

Il Network Europeo per le malattie polmonari rare (ERN-LUNG)

Marco Poeta, Francesca Santamaria

Pneumologia Pediatria

Volume 19, n. 73 - marzo 2019

Direttore Responsabile

Francesca Santamaria (Napoli)

Direzione Scientifica

Stefania La Grutta (Palermo)
Nicola Ullmann (Roma)

Segreteria Scientifica

Silvia Montella (Napoli)

Comitato Editoriale

Angelo Barbato (Padova)
Filippo Bernardi (Bologna)
Alfredo Boccaccino (Misurina)
Attilio L. Boner (Verona)
Mario Canciani (Udine)
Carlo Capristo (Napoli)
Fabio Cardinale (Bari)
Salvatore Cazzato (Bologna)
Renato Cutrera (Roma)
Fernando M. de Benedictis (Ancona)
Fulvio Esposito (Napoli)
Mario La Rosa (Catania)
Massimo Landi (Torino)
Gianluigi Marseglia (Pavia)
Fabio Midulla (Roma)
Luigi Nespoli (Varese)
Giorgio L. Piacentini (Verona)
Giovanni A. Rossi (Genova)
Giancarlo Tancredi (Roma)
Marcello Verini (Chieti)

Editore

Giannini Editore
Via Cisterna dell' Olio 6b
80134 Napoli
e-mail: editore@gianninisp.it
www.giannineditore.it

Coordinamento Editoriale

Center Comunicazioni e Congressi Srl
e-mail: info@centercongressi.com
Napoli

Realizzazione Editoriale e Stampa

Officine Grafiche F. Giannini & Figli SpA
Napoli

© Copyright 2018 by SIMRI
Finito di stampare nel mese di gennaio 2019

La Discinesia Ciliare Primaria

Primary ciliary dyskinesia

Nicola Ullmann, Lucia Lo Scalzo, Renato Cutrera

Dipartimento Pediatrico, U.O.C. Broncopneumologia, Dipartimento Pediatrico Universitario Ospedaliero Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma

Corrispondenza: Nicola Ullman **e-mail:** nnicola.ullmann@opbg.net

Riassunto: La discinesia ciliare primaria (DCP) è una malattia rara, determinata dalla compromissione congenita della *clearance* muco-ciliare a causa di alterazioni della struttura e/o della funzione delle ciglia. Essa è caratterizzata da una serie di manifestazioni cliniche, tra cui tosse catarrale quotidiana, bronchite cronica che esita in bronchiectasie, rinosinusite persistente, otite media cronica secretiva, *situs inversus* nel 50% dei casi, infertilità e gravidanza ectopica. La diagnosi si basa su una combinazione di dati clinici e di test diagnostici. Test per la misurazione dell'ossido nitrico nasale e nuovi questionari specifici possono essere utili per lo *screening* della DCP, ma generalmente richiedono una conferma con test di funzionalità ciliare e dell'ultrastruttura. Il PICADAR score, di recente introduzione, può predire la probabilità di essere di fronte a un soggetto affetto da DCP sulla base delle risposte a 7 variabili predittive di un semplice questionario. I test genetici hanno un ruolo crescente nella diagnosi di DCP. Attualmente, le strategie terapeutiche non si basano su raccomandazioni specifiche per la malattia, ma in parte sulle evidenze disponibili per la fibrosi cistica. Il pilastro terapeutico include manovre di *clearance* delle vie aeree mediante la fisioterapia del torace e la somministrazione di antibiotici per il controllo delle infezioni respiratorie.

Parole chiave: discinesia ciliare primaria, bambini, bronchiectasie, *clearance* muco-ciliare.

Summary: Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare disease characterized by congenital impairment of muco-ciliary clearance due to changes in the structure and/or function of the cilia. PCD presents a series of clinical manifestations, including daily wet cough, chronic bronchitis that results in bronchiectasis, persistent rhinosinusitis, chronic secretory otitis media, *situs inversus* in 50% of the cases, infertility and ectopic pregnancy. Diagnosis is based on a combination of clinical data and diagnostic tests. Measuring the production of nasal nitric oxide and a specific questionnaire are useful in PCD screening, but they generally require confirmation with tests that assess ciliary function and ultrastructure. The recently introduced PICADAR score can predict the probability of a subject to be affected by PCD based on the answers to 7 predictive variables from a simple questionnaire. Genetic tests play an increasing role in the diagnosis of PCD. Currently, therapeutic strategies are not based on specific recommendations for the disease, but are partly based on experience from cystic fibrosis. The therapeutic mainstay includes airway clearance maneuvers through chest physiotherapy and the administration of antibiotics to control respiratory infections.

Key words: primary ciliary dyskinesia, children, bronchiectasis, ciliary mucus clearance

INTRODUZIONE

La discinesia ciliare primaria (DCP) è una patologia clinicamente e geneticamente eterogenea, determinata da una compromissione congenita della *clearance* muco-ciliare a causa di alterazioni della struttura e/o della funzione delle ciglia respiratorie. Essa è una patologia rara, la cui prevalenza, che attualmente presenta un'elevata variabilità, è stimata tra 1:2.200 e 1:40.000. La prevalenza varia nei diversi Paesi, aspetto probabilmente dovuto alle percentuali di matrimoni tra consanguinei, alle differenze geografiche nei dati mutazionali, all'effetto fondatore di alcune mutazioni geniche o a un *iter* diagnostico che si avvale di esami complessi, a disposizione solo in pochi centri (1). La diagnosi di DCP, dunque, è spesso tardiva o può mancare completamente, a causa anche della scarsa conoscenza della malattia da parte degli operatori sanitari e della difficoltà a confermarla (2). I sintomi della DCP non sono specifici e non sorprende che i pazienti con *situs inversus* (SI) siano diagnosticati in età più precoce. In Europa, infatti, l'età media alla diagnosi è di 5,3 anni, mentre nei pazienti con SI associato si abbassa a 3,5 anni (3).

Nella Tabella 1 sono indicate le principali manifestazioni cliniche della DCP.

Tab.1: Manifestazioni cliniche della DCP		
Neonato	Bambino	Adulto
-Situs inversus -Distress respiratorio -Congestione nasale -Rinorrea persistente	-Situs inversus -Tosse catarrale cronica -Bronchiti/polmoniti -Bronchiectasie -Rinosinusiti (rara la poliposi nasale) -Agenesia di uno o più seni paranasali -Otite media ricorrente	-Situs inversus -Tosse catarrale cronica -Bronchiti/polmoniti -Bronchiectasie -Rinosinusiti e poliposi nasale -Agenesia di uno o più seni paranasali -Infertilità maschile -Gravidanza ectopica

FUNZIONALITÀ E STRUTTURA CILIARE

La DCP può essere causata da un difetto a livello dei polipeptidi dell'assonema delle ciglia o della coda dello spermatozoo, di proteine presenti nella membrana ciliare e nella matrice o di proteine necessarie per il corretto assemblaggio delle ciglia. Differenti componenti strutturali possono mancare o essere difettosi in diversi pazienti e, a seconda della natura della lesione, possono manifestarsi diverse manifestazioni cliniche (4, 5). Le ciglia mobili sono presenti sull'epitelio di tutto il tratto respiratorio, sulle cellule ependimali che rivestono i ventricoli del sistema nervoso centrale, negli ovidotti del sistema riproduttivo femminile e nel flagello degli spermatozoi (6). Sono costituite di un assonema formato da nove coppie di microtubuli periferici che circondano un'unica coppia di microtubuli centrali. Ponti di nexina connettono coppie di micro-tubuli periferici adiacenti, ciascuna delle quali costituita di un micro-tubulo completo (micro-tubulo A) e di un micro-tubulo parziale (micro-tubulo B) e connessa mediante i raggi di connessione alla coppia di micro-tubuli centrali. Ogni micro-tubulo A ha due bracci, uno interno ed uno esterno, formati di dineina, proteina motoria in grado di fornire energia per il movimento ciliare. Ogni ciglio è formato inoltre da un corpo basale che, connettendosi al centrosoma, permette di ancorare il ciglio al citoplasma apicale della cellula. A livello dell'epitelio respiratorio, questo tipo di ciglia facilita l'espulsione delle secrezioni mucose, svolgendo un importante meccanismo di difesa delle vie aeree.

Le mutazioni nei geni che codificano la struttura assonale e gli elementi accessori delle ciglia possono portare a DCP. Alcune mutazioni causano un'alterazione ultrastrutturale, altre una funzione ciliare anomala con ultrastruttura preservata.

GENETICA E DIFETTO CILIARE

Nella maggior parte dei casi la DCP è ereditata come malattia autosomica recessiva, sebbene siano noti modelli di ereditarietà legati al cromosoma X. Attualmente sono stati descritti 40 geni, ma questo numero è destinato ad aumentare nei prossimi anni. Molti dei difetti genici sono stati correlati ad alterazioni in specifici elementi ultrastrutturali: bracci esterni di dineina (*DNAH5*, *DNAH9*, *DNAH12*, *DNAI1*, *ARMC4*, *CCDC103*), bracci interni di dineina (*DNALI1*), raggi di connessione ed apparato centrale (*RSPH4A*, *RSPH9*).

I modelli di battito ciliare sono anche stati collegati a specifici difetti genetici e ultrastrutturali (7). I difetti del braccio esterno della dineina, con o senza anomalie del braccio interno, portano a ciglia praticamente immobili, mentre i difetti dell'apparato centrale creano moti circolari e vorticosi (8).

MANIFESTAZIONI CLINICHE

A qualsiasi età, la DCP presenta un'elevata variabilità nella presentazione clinica, sebbene le

principali manifestazioni siano le infezioni ricorrenti del tratto respiratorio superiore e inferiore.

-Manifestazioni polmonari

I neonati con DCP spesso presentano *distress* respiratorio caratterizzato da dispnea con tachipnea e lieve ipossiemia che talvolta richiede ossigenoterapia (9). Quando il bambino cresce, si riscontrano comunemente tosse catarrale ed espettorazione di materiale mucopurulento. I pazienti presentano infezioni ricorrenti delle basse vie aeree, sviluppando bronchiti e broncopolmoniti. Nella prima infanzia i principali agenti infettanti, rilevati dalle colture dell'espettorato, sono *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, mentre in età adulta soprattutto *Pseudomonas aeruginosa* e micobatteri non tubercolari.

La radiografia del torace e la tomografia computerizzata ad alta risoluzione mostrano un grado moderato di iperinflazione, ispessimento peribronchiale, atelettasie e bronchiectasie (10). Sebbene lo sviluppo delle bronchiectasie aumenti in età adulta, esse sono state evidenziate anche nei bambini con PCD, soprattutto nel lobo polmonare medio ed in quelli inferiori (11). La spirometria spesso rivela un'ostruzione delle vie respiratorie da lieve a moderata, con risposta variabile ai broncodilatatori.

-Rinosinusiti

L'ostruzione nasale e/o la rinorrea persistente è molto comune a tutte le età e presente in quasi il 100% delle persone con DCP anche nel primo anno di vita (12). Fin dall'età pediatrica sono presenti sintomi da sinusite cronica e alla tomografia computerizzata è talvolta riscontrabile l'agenesia dei seni frontali e sfenoidali (13). La poliposi nasale è frequentemente presente ed è più tipica dell'età adulta. I pazienti con DCP possono anche presentare un alterato o assente senso dell'olfatto.

-Otiti

L'otite media effusiva cronica con episodi ricorrenti di otite media acuta è presente durante l'infanzia e l'adolescenza, ma diventa molto meno frequente dopo la pubertà (14). L'insorgenza di una ipoacusia trasmissiva è comune.

-Situs inversus

Il SI nella DCP si verifica generalmente come un'inversione completa del sistema circolatorio e dei visceri ed è presente in circa il 50% dei pazienti. Nel periodo prenatale, in presenza di questo reperto identificato ecograficamente, può essere posto il sospetto di DCP. Quest'anomalia è conseguente ad un'alterazione a carico delle ciglia nodali. Questo tipo di ciglia è presente solo durante lo sviluppo embrionale ed è caratterizzato da un movimento rotazionale, causando un flusso sinistrorso di fattori di trascrizione (15). Si parla di sindrome di Kartagener quando il SI è presente in un paziente affetto da DCP.

-Fertilità

Frequentemente gli uomini con DCP sono infertili per l'anomala o assente motilità spermatica, mentre le donne possono avere gravidanze ectopiche ed uno stato di sub-fertilità a causa della compromissione della funzione ciliare nelle tube di Falloppio (16). I pazienti di sesso maschile dovrebbero essere informati sulla possibile infertilità e dovrebbe essere effettuata l'analisi dello sperma.

-Altre comorbidità

Esistono una serie di condizioni cliniche che, nel caso vengano diagnosticate, richiedono di escludere la DCP, in particolare se esiste una storia familiare o se il paziente ha altre caratteristiche cliniche tipiche della patologia. Esse sono: la presenza di cardiopatie congenite complesse, soprattutto se con disordini di lateralità, l'asplenia, il rene policistico, l'idrocefalo, l'atresia biliare e la retinite pigmentosa (17). L'alterazione ultrastrutturale delle ciglia primarie si associa a queste differenti patologie.

DIAGNOSI

Come descritto nelle linee guida pubblicate dall'*European Respiratory Society*, per una diagnosi accurata di DCP sono necessari una combinazione di test diagnostici e un fenotipo clini-

co tipico. Non è stato infatti definito alcun test diagnostico “gold standard” per questa patologia (18). Il test per la misurazione dell’ossido nitrico nasale può essere utile per lo *screening*, ma richiede una conferma con test di funzionalità ciliare e dell’ultrastruttura. Il ruolo dei test genetici sta cambiando con l’identificazione di un maggior numero di mutazioni che causano la DCP e che, quando sono riscontrate, permettono di formulare diagnosi.

Di recente è stato introdotto un questionario (il PICADAR score), utile per valutare la probabilità che un paziente con tosse catarrale persistente insorta nella prima infanzia sia affetto da DCP. Il punteggio finale (tabella 2) è frutto della somma dei punteggi relativi a 7 variabili predittive. I pazienti con un punteggio PICADAR ≥ 10 hanno più del 90% di probabilità di risultare positivi ai test per la DCP, mentre un punteggio ≥ 5 indica più dell’11% di possibilità di avere la DCP(20). Data la rarità della patologia e la difficoltà dell’analisi e dell’interpretazione dei test, la diagnosi andrebbe confermata in un centro specialistico di riferimento.

Tab. 2: Tabella PICADAR score (modificata da 20)

Domanda	Risposta	Punteggio
Il paziente ha una storia di tosse catarrale quotidiana insorta nella prima infanzia?	SI: completare il questionario NO: STOP, non procedere con il questionario	
Il paziente è nato a termine oppure no?	A termine	2
Ha presentato sintomi respiratori nel periodo neonatale (tachipnea, tosse, polmonite, ecc)?	Sì	2
È stato ricoverato in terapia intensiva neonatale?	Sì	2
Ha un’alterazione della lateralità (<i>situs inversus</i> o eterotassia)?	Sì	4
Ha un difetto cardiaco congenito?	Sì	2
Ha una rinite persistente?	Sì	1
Ha presentato sintomi cronici a carico dell’orecchio o alterazioni dell’udito?	Sì	1
Punteggio totale:		

-Ossido nitrico nasale

La misurazione della quantità di ossido nitrico nasale (nNO), che è molto bassa o assente nei pazienti con DCP, è un test di *screening* utile per pazienti di età ≥ 5 anni con sospetto clinico di DCP (18). Il test è sensibile, rapido e non invasivo ed i suoi risultati sono immediatamente disponibili. È stato riportato che un valore di nNO inferiore a 77 nl/min suggerisce fortemente la DCP, con una sensibilità del 94% e una specificità del 84% (19). Tuttavia, in alcuni casi dimostrati di DCP i livelli di nNO possono essere normali. Ciò evidenzia che i pazienti con elevato sospetto clinico per DCP devono essere valutati mediante procedure diagnostiche aggiuntive. È importante sottolineare che altre condizioni respiratorie, come la fibrosi cistica e l’infezione virale acuta, possono presentarsi con bassi valori di nNO (21).

-Analisi della funzione e della struttura ciliare La diagnosi di DCP richiede l’analisi delle cellule dell’epitelio ciliato per studiarne sia la struttura, sia la funzione. I campioni di epitelio ciliato si possono ottenere mediante *brushing* nasale o mediante broncoscopia. È importante che il paziente non presenti e non abbia presentato nelle 4-6 settimane precedenti infezioni acute delle vie aeree superiori; ciò minimizza il rischio di ottenere campioni di ciglia scarsi o con discinesia secondaria.

Le linee guida dell’*European Respiratory Society* suggeriscono di eseguire, per pazienti con caratteristiche cliniche suggestive di DCP, prima la video-microscopia ad alta velocità (HSVA) e successivamente di procedere alla microscopia elettronica a trasmissione (TEM) se l’HSVA è anormale o inconclusiva (18). L’HSVA viene utilizzata per determinare se le ciglia hanno normale coordinazione, frequenza e *pattern* di battito. L’analisi TEM viene eseguita quando la diagnosi è incerta dopo HSVA, ma può anche essere eseguita per identificare il tipo di anomalia strutturale. La TEM può essere diagnostica se sono identificati i difetti ultrastrutturali ciliari distintivi (21). Tuttavia, la TEM può essere normale in circa il 10-20% dei pazienti con DCP e pertanto non può essere considerata come singolo test diagnostico.

-Coltura cellulare

La coltura cellulare viene utilizzata per risolvere i danni secondari che possono mimare la DCP, riducendo quindi i falsi positivi (22).

-Test genetico

In un paziente con caratteristiche cliniche fortemente suggestive per DCP la diagnosi finale può essere confermata con test genetici che mostrano omozigosi o eterozigosi composta per varianti patogene. Il ruolo dei test genetici per la diagnosi di DCP si sta evolvendo con la crescente disponibilità di pannelli genetici estesi (23).

-Misure di trasporto mucociliare

Misurare il trasporto mucociliare con tracciante radioattivo è un test di *screening* della funzione ciliare, ma non standardizzato e ad oggi non più raccomandato. Il tempo di saccarina non è un test di *screening* affidabile per DCP.

TRATTAMENTO

Attualmente, le strategie terapeutiche della DCP non si basano su raccomandazioni validate specifiche per la malattia, ma in parte sulle evidenze disponibili per la fibrosi cistica, nonostante le differenze nella fisiopatologia dei due disturbi. In generale, il trattamento deve essere individualizzato in base al decorso clinico specifico del paziente.

Il cardine del trattamento della DCP è rappresentato dalla *clearance* delle vie aeree, dal controllo e dalla prevenzione delle infezioni e dall'eliminazione di fattori scatenanti, incluso il fumo passivo. Gli interventi per migliorare la *clearance* delle secrezioni e ridurre le infezioni respiratorie comprendono la fisioterapia quotidiana e il trattamento antibiotico precoce delle infezioni respiratorie. La terapia antibiotica (meglio se guidata dall'antibiogramma dell'esame colturale dell'espettorato) va impostata a dosaggi adeguati non appena si verificano peggioramenti dei sintomi, delle secrezioni respiratorie o della funzionalità respiratoria.

Il trattamento precoce delle infezioni respiratorie può ritardare l'insorgenza delle bronchiectasie e minimizzare la perdita progressiva della funzione polmonare. L'efficacia dell'utilizzo della soluzione ipertonica nebulizzata e degli agenti mucolitici (ad esempio, DNasi) non è molto chiara nella DCP (24). È sempre consigliabile la vaccinazione antinfluenzale e antipneumococcica. Per i pazienti con riacutizzazioni ricorrenti, può essere presa in considerazione una terapia antibiotica profilattica, spesso con un macrolide.

La gestione medica della rinosinusite cronica include il lavaggio nasale con soluzione salina, i glucocorticoidi inalatori per la poliposi nasale e la terapia antibiotica per le riacutizzazioni. In un sottogruppo di pazienti possono essere necessari interventi chirurgici di competenza otorinolaringoiatrica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Mirra V, Werner C, Santamaria F. *Primary Ciliary Dyskinesia: An Update on Clinical Aspects, Genetics, Diagnosis, and Future Treatment Strategies*. *Front Pediatr* 2017; 5: 135.
- (2) Coren ME, Meeks M, Morrison I, et al. *Primary ciliary dyskinesia: age at diagnosis and symptom history*. *Acta Paediatr* 2002; 91: 667- 669.
- (3) Kuehni CE, Frischer T, Strippoli MP, et al. *Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children*. *Eur Respir J* 2010; 36: 1248-1258.
- (4) Vallet C, Escudier E, Roudot-Thoraval F, et al. *Primary ciliary dyskinesia presentation in 60 children according to ciliary ultrastructure*. *Eur J Pediatr* 2013; 172: 1053.
- (5) Davis SD, Ferkol TW, Rosenfeld M, et al. *Clinical features of childhood primary ciliary dyskinesia by genotype and ultrastructural phenotype*. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 316.
- (6) Horani A, Ferkol TW, Dutcher SK, et al. *Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia*. *Paediatr Respir Rev* 2016; 18: 18-24.
- (7) Horani A, Ustione A, Huang T, et al. *Establishment of the early cilia preassembly protein complex during motile ciliogenesis*. *Proc Nat Acad Sci USA* 2018; 115: 1221-1228.
- (8) Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C. *Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia*. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 518-524.
- (9) Mallowney T, Manson D, Kim R, et al. *Primary ciliary dyskinesia and neonatal respiratory distress*. *Pediatrics* 2014; 134: 1160-1166.
- (10) Santamaria F, Montella S, Tiddens HAWM, et al. *Structural and functional lung disease in primary ciliary dyskinesia*. *Chest* 2008; 134: 351.
- (11) Kennedy MP, Noone PG, Leigh MW, et al. *High-resolution CT of patients with primary ciliary dyskinesia*. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: 1232.
- (12) Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, et al. *Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome*. *Genet Med* 2009; 11: 473.
- (13) Pifferi M, Bush A, Caramella D, et al. *Agensis of paranasal sinuses and nasal nitric oxide in primary ciliary dyskinesia*. *Eur Respir J* 2011; 37: 566-571.
- (14) Leigh MW, Zariwala MA, Knowles MR. *Primary ciliary dyskinesia: improving the diagnostic approach*. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21: 320.
- (15) Pennekamp P, Menchen T, Dworniczak B, et al. *Situs inversus and ciliary abnormalities: 20 years later what is the connection?* *Cilia* 2015; 4: 1.
- (16) Afzelius BA. *Cilia-related diseases*. *J Pathol* 2004; 204: 470-477.
- (17) Kennedy MP, Omran H, Leigh MW, et al. *Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia*. *Circulation* 2007; 115: 2814.
- (18) Lucas JS, Barbato A, Collins SA, et al. *European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia*. *Eur Respir J* 2017; 4: 49.
- (19) Collins SA, Behan L, Harris A, et al. *The dangers of widespread nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia*. *Thorax* 2016; 71:560-1
- (20) Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, et al. *PICADAR: a diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia*. *Eur Respir J* 2016; 47: 1103-1112.
- (21) Boon M, Smits A, Cuppens H, et al. *Primary ciliary dyskinesia: critical evaluation of clinical symptoms and diagnosis in patients with normal and abnormal ultrastructure*. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9: 11.
- (22) Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, et al. *Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children*. *Eur Respir J* 2009; 34: 1264.
- (23) Djakow J, Kramná L, Dušátková L, et al. *An effective combination of sanger and next generation sequencing in diagnostics of primary ciliary dyskinesia*. *Pediatr Pulmonol* 2016; 51: 498.
- (24) ten Berge M, Brinkhorst G, Kroon AA, et al. *DNase treatment in primary ciliary dyskinesia-- assessment by nocturnal pulse oximetry*. *Pediatr Pulmonol* 1999; 27: 59.