

PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

CASI CLINICI PER IMPARARE E TECNICHE DIAGNOSTICHE INNOVATIVE IN PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

Tecniche diagnostiche innovative in fisiologia
respiratoria: il Multiple Breath Washout (MBW)
nell'asma in età pediatrica

La genetica molecolare:
casi clinici per imparare

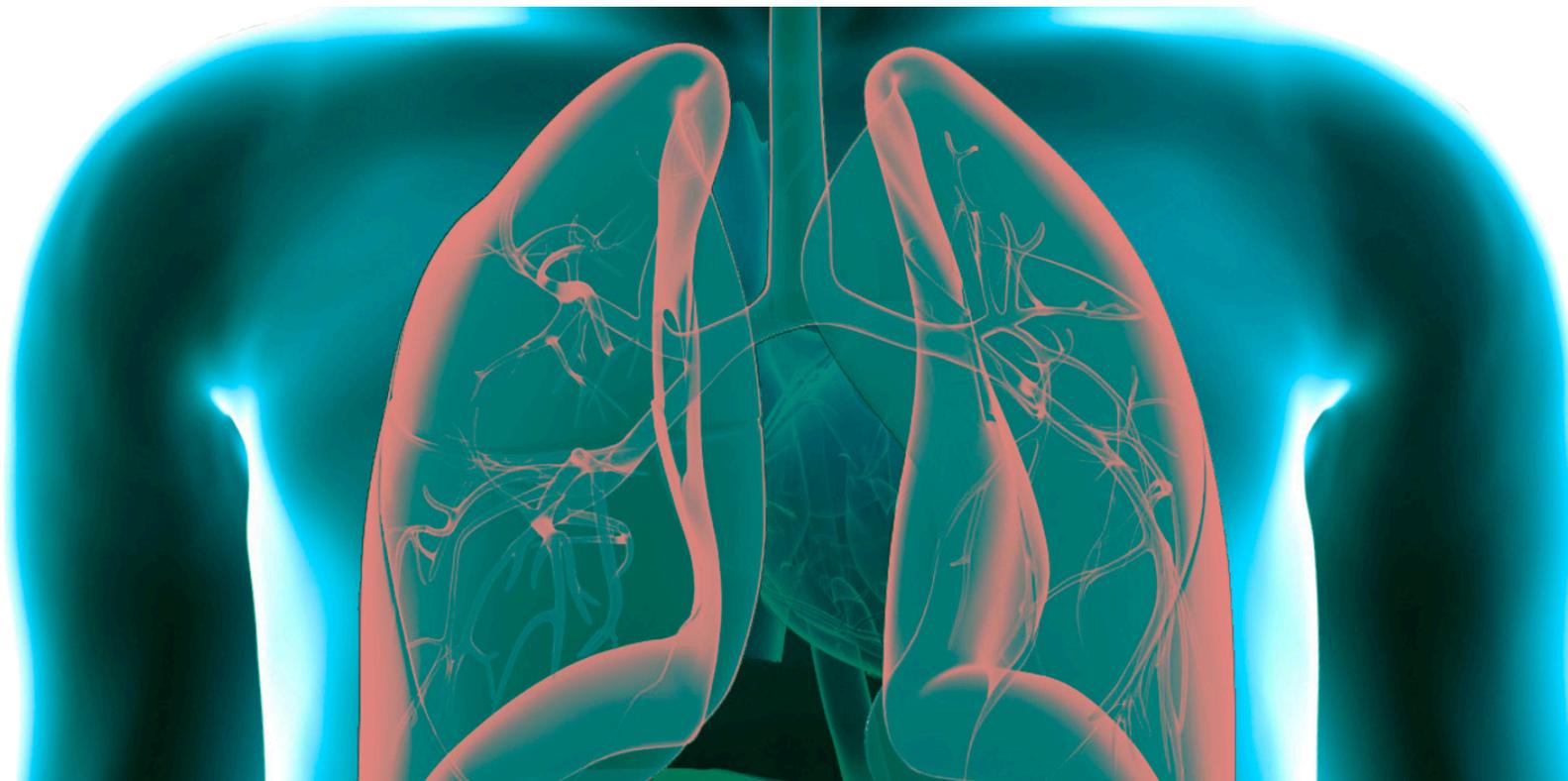
L'ecografia polmonare per il pediatra

Interventistica in pneumologia: dilatazione tracheo-
bronchiale tramite balloon e "cutting" balloon

Allergologia molecolare

Studi del sonno

Allergologia molecolare



INDICE

Editoriale

Valeria Caldarelli

3

Tecniche diagnostiche innovative in fisiologia respiratoria: il Multiple Breath Washout (MBW) nell'asma in età pediatrica

Giuliana Ferrante, Maria Furno

4

La genetica molecolare: casi clinici per imparare

Federica Porcaro, Carlo De Pieri

12

L'ecografia polmonare per il pediatra

Giuseppe Gallo, Simone Fontijn, Elena Proietti, Giulia Cangiano, Matteo Giuliari, Valeria Lucianer, Francesca Sorrentino, Grazia Dinnella, Lorenzo Iughetti, Ugo Pradal

21

Interventistica in pneumologia: dilatazione tracheo-bronchiale tramite balloon e "cutting" balloon

Antonella Frassanito, Antonino Francesco Capizzi

31

Allergologia molecolare

Carla Mastrorilli, Paola Di Filippo

37

Studi del sonno

Ambra Nicolai, Alessandro Onofri

45

Indagine sulla formazione in pneumologia pediatrica nelle scuole di specializzazione in pediatria

Maria Di Cicco, Valeria Caldarelli, Sylvie Tagliati, Vincenzo Insinga, Roberto Raschetti, Renato Cutrera

54

Pneumologia Pediatrica

Volume 18, n. 71 - settembre 2018

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 Nespole (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@gianninispa.it

www.gianninieditore.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 novembre 2018

Informazioni per gli autori e norme per la preparazione per gli articoli

La Rivista pubblica contributi redatti in forma di editoriali, articoli d'aggiornamento, articoli originali, casi clinici, lettere al Direttore, recensioni (da libri, lavori, congressi), relativi a problemi pneumologici e allergologici del bambino. I contributi devono essere inediti, non sottoposti contemporaneamente ad altra Rivista, ed il loro contenuto conforme alla legislazione vigente in materia di etica della ricerca. Gli Autori sono gli unici responsabili delle affermazioni contenute nell'articolo e sono tenuti a dichiarare di aver ottenuto il consenso informato per la sperimentazione e per la riproduzione delle immagini. La redazione accoglie solo i testi conformi alle norme editoriali generali e specifiche per le singole rubriche. La loro accettazione è subordinata alla revisione critica di esperti, all'esecuzione di eventuali modifiche richieste ed al parere conclusivo del Direttore.

NORME EDITORIALI GENERALI

Il **testo** in lingua italiana, deve essere materialmente digitato col programma Microsoft Word® 2004 e successivi (per Mac OS X e Windows) e corredato di:

- (1) nome, cognome e affiliazione degli Autori, evidenziando per ciascun autore l'affiliazione in apice con numeri cardinali;
- (2) titolo del lavoro in italiano va scritto in grassetto, quello in inglese in corsivo grassetto;
- (3) Il riassunto va scritto in italiano e in inglese, così come le parole chiave (la somma delle battute, spazi inclusi, non deve superare i 1700 caratteri ciascuno, comprendendo in esse anche le parole chiave);
- (4) nome, cognome, ed e-mail dell'Autore referente per la corrispondenza;
- (5) bibliografia completa con voci numerate progressivamente con richiami univoci nel testo tra parentesi tonde;
- (6) Le tabelle e le figure integrate da didascalie e legende vanno numerate ed indicate nel testo progressivamente.

Il testo va preparato secondo le norme internazionali (Vancouver system) per garantire l'uniformità di presentazione (BMJ 1991; 302: 338-341). È dunque indispensabile dopo un'introduzione, descrivere i materiali e i metodi, l'indagine statistica utilizzata, i risultati, e la discussione con una conclusione finale. Gli stessi punti vanno riportati nel riassunto.

Le quantità editoriali devono essere le seguenti:

ARTICOLO	CASO CLINICO
Al massimo 20.000 caratteri spazi inclusi esclusa la bibliografia e le tabelle	Al massimo 15.000 caratteri spazi inclusi esclusa la bibliografia e le tabelle
Al massimo 4 figure o tabelle	Al massimo 4 figure o tabelle
Al massimo 23 referenze bibliografiche	Al massimo 15 referenze bibliografiche

Le tabelle devono essere materialmente digitate in numero contenuto (evitando di presentare lo stesso dato in più forme).

Le figure vanno fornite su supporto digitale in uno dei seguenti formati: .tif, .jpg e .eps e con una risoluzione adeguata alla riproduzione in stampa (300 dpi) oppure file vettoriali generati da Adobe Illustrator®.

Sono riproducibili, benché con bassa resa qualitativa, anche documenti generati da Microsoft PowerPoint® e da Microsoft Word®. Al contrario, non sono utilizzabili in alcun modo le immagini generate da CorelDRAW®.

Le dimensioni massime da rispettare per tabelle e figure sono:

Centimetri 8X6; Centimetri 8X11,5 (in verticale); Centimetri 16X11,5 (in orizzontale)

La Redazione si riserva di rifiutare il materiale iconografico ritenuto tecnicamente non idoneo.

La bibliografia va limitata alle voci essenziali identificate nel testo con numeri cardinali tra parentesi ed elencate nell'ordine in cui sono state citate. Se gli autori sono fino a tre si riportano tutti; se sono quattro o più si riportano solo i primi tre seguiti da "et al."

Esempi di come citare la bibliografia:

ARTICOLI E RIVISTE

1) Zonana J, Sarfarazi M, Thomas NST, et al. *Improved definition of carrier status in X-linked hypohydrotic ectodermal dysplasia by use of restriction fragment length polymorphism-based linkage analysis*. J Pediatr 1989; 114: 392-395.

LIBRI

2) Smith DW. *Recognizable patterns of human malformation*. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders Co. 1982.

CAPITOLI DI LIBRI O ATTI DI CONGRESSI

3) Krmptotic-Nemanic J, Kostovis I, Rudan P. *Aging changes of the form and infrastructure of the external nose and its importance in rhinoplasty*. In: Conly J, Dickinson JT, (eds). "Plastic and reconstructive surgery of the face and neck". New York, NY: Grune and Stratton 1972: 84-95.

Ringraziamenti, indicazioni di grant o borse di studio, vanno citati al termine della bibliografia. Termini matematici, formule, abbreviazioni, unità e misure devono conformarsi agli standard riportati in "Scienze" (1954; 120: 1078). I farmaci vanno indicati col nome del principio attivo.

I Lavori vanno inviati a:

Center Comunicazione e congressi all'indirizzo

email: redazionePP_SIMRI@centercongressi.com.

QUESITI DI NATURA SCIENTIFICA VANNO INDIRIZZATI:

Dott.ssa Francesca Santamaria

e-mail: santamar@unina.it

RICHIESTA ESTRATTI

L'Editore si impegna a fornire agli Autori che ne facciano richiesta un pdf del proprio Articolo.

ABBONAMENTI

Pneumologia Pediatrica è trimestrale. Viene pubblicata sul sito della società www.simri.it, ed è disponibile online solo per i soci della Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili.

Per i non soci i prezzi di abbonamento annuo per poter accedere alla rivista sono i seguenti: Italia ed Estero: €72,00; singolo fascicolo: €20,00.

Editoriale

Carissimi colleghi,

questo numero è una novità nella novità! L'obiettivo formativo principale è quello di portare all'attenzione di tutti i lettori le tecniche diagnostiche pneumologiche innovative. Questo numero è strutturato in capitoli cui corrisponde prima la presentazione di tecniche diagnostiche innovative poi un caso clinico didattico. L'ulteriore novità sta nel fatto che questo numero è stato curato completamente da membri SIMRI appartenenti al Forum Junior Members.

Il primo capitolo presenta la tecnica della Multiple Breath Washout (MBW), metodica di fisiopatologia respiratoria che può essere utilizzata quando la spirometria non è in grado di evidenziare il coinvolgimento delle piccole vie aeree o la presenza di disomogeneità ventilatoria.

Sappiamo che tale tecnica è stata lungamente utilizzata nei pazienti con fibrosi cistica ma di recente viene utilizzata anche nell'asma in età pediatrica. Successivamente viene presentato l'utilizzo della genetica molecolare nell'inquadramento delle malattie respiratorie su base genetica che in genere viene utilizzata nei centri di pneumologia di 3° livello ma che deve essere nota a tutti coloro che seguono pazienti con problemi respiratori con diagnosi complessa, anche solo per un corretto invio ai centri di riferimento.

Nel capitolo seguente viene messo in evidenza quanto la broncoscopia rappresenta una metodica con valenza sia diagnostica che terapeutica, è possibile infatti eseguire biopsie, effettuare trattamenti laser, posizionare stent e dilatare le vie aeree mediante palloncino ottenendo ottimi risultati sulla salute dei bambini, specie con patologia malformativa.

Viene poi presentata una metodica da tempo utilizzata in medicina che sempre più frequentemente trova indicazione in ambito diagnostico con estrema soddisfazione da parte di chi si occupa di bambini grazie all'assenza di effetti collaterali cui è associata.

Si passa poi ad un capitolo sull'allergologia molecolare che spiega le varie possibilità diagnostiche offerte in campo allergologico.

Tali metodiche permettono di predire la severità delle reazioni allergiche e la loro storia. Infine viene presentato un capitolo sui disturbi respiratori nel sonno. Tali disturbi devono essere noti a tutti i pediatri in considerazione della frequenza di bambini con apnee nel sonno associate ad altri fattori predisponenti (l'obesità, l'ipertrofia adeno-tonsillare e le malformazioni cranio-facciali), conoscere queste patologie infatti è necessario per un corretto timing nell'invio dei pazienti ai centri specializzati.

L'ultimo capitolo è invece stato dedicato a riportare l'indagine condotta sulla formazione in pneumologia pediatrica nelle scuole di specializzazione in pediatria descrivendo lo stato dell'arte nella formazione in pneumologia pediatrica nelle scuole di specializzazione.

Concludo questo editoriale ringraziando la redazione per aver permesso ai colleghi appartenenti al *Forum Junior Members* di rendere fruibile le loro conoscenze in ambito pneumologico pediatrico. Mi auguro sinceramente che i lettori di questo numero della nostra rivista possano trovare interesse alla lettura dei diversi articoli.

Buona lettura a tutti

Valeria Caldarelli

Tecniche diagnostiche innovative in fisiologia respiratoria: il Multiple Breath Washout (MBW) nell'asma in età pediatrica

Innovative diagnostic techniques in Respiratory Physiology: the Multiple Breath Washout (MBW) in childhood asthma

Giuliana Ferrante¹, Maria Furno²

¹*Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute e Materno Infantile "G. D'Alessandro", Università degli Studi di Palermo*

²*Clinica Pediatrica e Malattie Rare, AO "G. Brotzu", Cagliari*

Corrispondenza: Giuliana Ferrante **email:** giuliana.ferrante@unipa.it

Riassunto: L'asma è una patologia infiammatoria delle vie aeree, valutata principalmente mediante l'esame spirometrico. Tuttavia, tale tecnica può non essere in grado di evidenziare il coinvolgimento delle piccole vie aeree o la presenza di disomogeneità ventilatoria. A tale scopo può essere di ausilio l'utilizzo del *Multiple Breath Washout* (MBW), una tecnica che si basa sulla clearance polmonare di un gas tracciante (solitamente O₂). Il MBW richiede soltanto collaborazione passiva e respirazione a volume corrente; pertanto, ben si adatta a essere utilizzato in età pediatrica. Il *Lung Clearance Index* (LCI) è stato utilizzato con successo specialmente nel monitoraggio dei bambini con fibrosi cistica, mentre molto più recenti e meno numerosi sono i dati sulle applicazioni cliniche e di ricerca del MBW nell'asma pediatrico. Il caso clinico qui presentato mostra l'applicazione di questa tecnica nella gestione di un bambino asmatico sottoposto a terapia cortisonica inalatoria ad alto dosaggio.

Parole chiave: asma, multiple breath washout, lung clearance index

Summary: Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways which is mainly evaluated by spirometry. However, this technique may not always detect the small airways involvement or the presence of ventilation inhomogeneity. At this purpose, the Multiple Breath Washout (MBW), a technique based on pulmonary clearance of a tracer gas (generally O₂), could be useful in describing the inflammatory involvement of small airways. MBW requires only passive collaboration and current-volume breathing, being thus well suited for use in the pediatric age. Lung Clearance Index (LCI) has been successfully used especially in children with cystic fibrosis, while data on the clinical and research applications of MBW in pediatric asthma are more recent and less numerous. In the present clinical case, MBW has been used to manage an asthmatic child treated with high dose inhaled corticosteroids.

Keywords: asthma, multiple breath washout, lung clearance index

INTRODUZIONE

L'asma è una patologia infiammatoria cronica delle vie aeree, la cui diagnosi e gestione nel *follow-up* si basano essenzialmente sugli aspetti clinici e sulla valutazione funzionale attraverso l'esame spirometrico (1). La semplicità di esecuzione e di interpretazione dei risultati ottenuti mediante la spirometria ha reso possibile l'ampia diffusione ed utilizzo di questa tecnica in età pediatrica anche al di fuori di ambiti esclusivamente pneumologici (2).

Tuttavia, in alcuni casi si osserva una scarsa correlazione tra il dato clinico e quello funzionale spirometrico. Il coinvolgimento delle vie aeree distali nei pazienti asmatici potrebbe giustificare questo fenomeno e, nel lungo termine, potrebbe spiegare perché alcuni soggetti con buon controllo della malattia vadano incontro ad un accelerato declino della funzione polmonare in età adulta. Alcuni studi in bambini asmatici hanno evidenziato valori anomali di flusso espiratorio forzato (FEF)₂₅₋₇₅ in presenza di valori normali di volume espiratorio forzato nel primo secondo (FEV₁) (3), ma al momento non esistono ancora risultati definitivi sulla validità e sulla riproducibilità del FEF₂₅₋₇₅ come parametro sensibile di ostruzione bronchiale periferica.

Sulla base di tali considerazioni, negli ultimi anni è cresciuto sempre più l'interesse per l'applicazione di tecniche di fisiopatologia respiratoria in grado di valutare gli effetti dell'infiammazione a livello periferico ed utili per studiare la disfunzione delle piccole vie aeree nell'asma pediatrico.

MULTIPLE BREATH WASHOUT (MBW): TECNICA E VALORI DI RIFERIMENTO

Il *Multiple Breath Washout* (MBW) è una tecnica che richiede soltanto collaborazione passiva e respirazione a volume corrente e pertanto ben si adatta ad essere utilizzata in età pediatrica. Essa permette di valutare l'eventuale presenza di disomogeneità ventilatoria a livello polmonare attraverso l'analisi della *clearance* di un gas inerte utilizzato come tracciante.

L'attrezzatura è composta di uno spettrometro di massa combinato con un flussimetro.

Esistono due metodi per eseguire il MBW: si può utilizzare un gas tracciante inerte, come il solfuro esa-fluoride, l'elio, l'Argon o una miscela di questi gas (alcuni, peraltro, non facilmente disponibili), oppure si può utilizzare l'ossigeno (O_2) al 100% (N_2 -MBW, che fa riferimento all'azoto presente a livello polmonare). I gas utilizzati devono possedere alcuni requisiti: essere sicuri, non partecipare agli scambi gassosi e non diffondere in maniera significativa nel circolo sanguigno o ad altri tessuti; considerando che l' O_2 è facilmente disponibile per usi medicali e che è un gas che non presenta effetti avversi sull'ambiente, né sull'essere umano, la metodica N_2 -MBW risulta più applicabile nella realtà clinica. Nel N_2 -MBW il paziente respira esclusivamente O_2 al 100%.

In tal modo si riduce progressivamente l'azoto residente nei polmoni, finché questi ne rimangono completamente privi. Il volume di azoto liberato durante l'espirazione è misurato da un analizzatore e rappresenta il volume d'aria nel polmone a fine espirazione

Conoscendo la concentrazione polmonare di azoto all'inizio e alla fine dell'esame e la quantità totale di gas che il paziente ha espirato, è possibile misurare la capacità funzionale residua (CFR), intesa come rapporto tra il volume totale del gas tracciante (o dell'azoto residente) esalato alla fine del *wash-out* ($V_{[TRACER]}$) e la differenza tra la frazione dello stesso all'inizio e alla fine del *wash-out* ($C_{Init} - C_{End}$). La tecnica consente di valutare lo stato di ventilazione polmonare attraverso l'analisi del profilo della curva di diluizione.

L'espiazione fino al volume residuo è seguita dall'inalazione di O_2 al 100% fino alla capacità polmonare totale; successivamente avviene la fase di *wash-out* durante l'espiazione, a partire dalla capacità polmonare totale fino al volume residuo.

La curva ottenuta è distinta in quattro fasi: spazio morto (I), fase bronchiale (II), fase alveolare (III) e fase di incremento rapido alla fine dell'espiazione (IV) (figura 1).

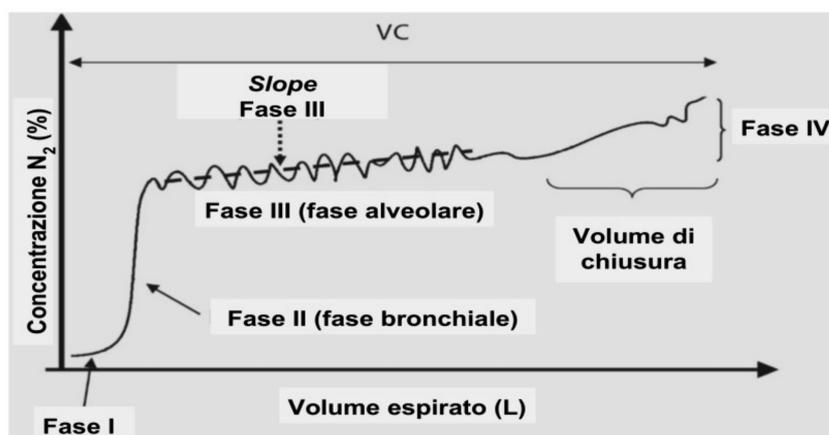


Fig.1: Illustrazione schematica della curva ottenuta nella fase di *wash-out*.

La fase III è calcolata tra il 25% ed il 75% del volume espirato ed un suo incremento è indicativo di disomogeneità della ventilazione. L'utilizzo di gas inerti esogeni prevede una fase aggiuntiva di *wash-in* durante la manovra di inspirazione dal volume residuo fino alla capacità polmonare totale, prima del *wash-out* durante la manovra di espiazione fino al volume residuo (4). Misurando in maniera continua la concentrazione del gas tracciante durante la respirazione a volume corrente, si ottengono i volumi di gas inspirati ed espirati dal paziente.

Nelle patologie ostruttive si possono verificare marcate alterazioni della ventilazione polmo-

nare a causa di accumulo di secrezioni mucose o di infiammazione e danno della parete bronchiale, pur in presenza di un esame spirometrico normale.

Il MBW permette di rilevare queste alterazioni fisiopatologiche e di localizzarle.

Mentre, infatti, la concentrazione di gas espirato dal soggetto sano è uguale per ogni atto espiratorio e la curva ha un decadimento lineare e progressivo, in presenza di ostruzioni polmonari la velocità con cui l'azoto viene eliminato è dipendente dal singolo distretto polmonare (compartimenti veloci e compartimenti lenti). Recentemente sono state pubblicate le procedure standardizzate per l'uso del MBW in età pediatrica ed i criteri di accettabilità (tabella 1) (4).

Tab.1: MBW: procedura standardizzata e criteri di accettabilità. Modificata da Robinson PD et al.

MBW: procedura standardizzata e criteri di accettabilità
Procedura standardizzata
Posizione del capo Lattanti: posizione supina con la testa in linea mediana Bambini: posizione seduta con la testa in linea mediana
Interfaccia Lattanti e prescolari: maschera facciale Bambini: boccaglio e stringinaso
Aderenza alle linee guida per il controllo delle infezioni
Criteri di accettabilità
Pattern del respiro regolare
Assenza di tosse
Assenza di perdite di gas durante l'esecuzione del test
Variabilità della CFR <25% in tre prove (in caso di variabilità di CFR o LCI >10%, non escludere il test ma provare a ripeterlo)

CFR: capacità funzionale residua; LCI: Lung Clearance Index

Secondo le attuali raccomandazioni, la tecnica deve essere eseguita mentre il bambino è seduto o supino e respira a volume corrente attraverso un boccaglio o una maschera adesiva al volto, indossando uno stringinaso (figura 2).

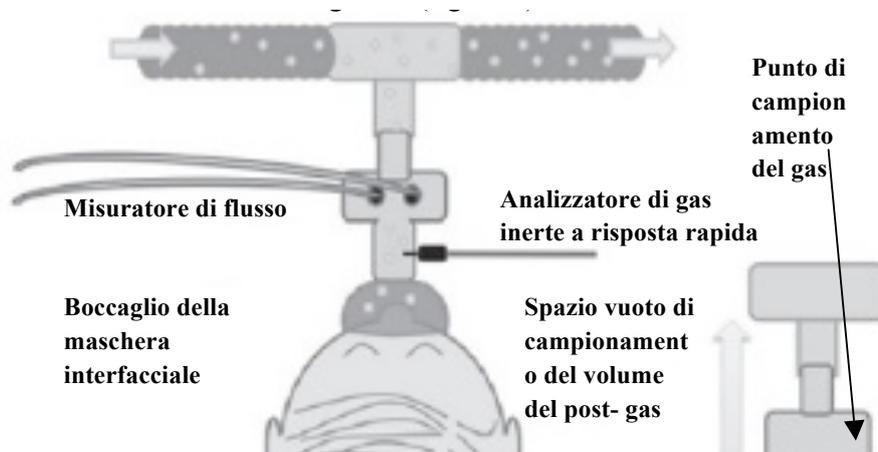


Fig.2: Illustrazione schematica di un sistema generico di wash-out. Robinson PD et al.⁴

Il controllo di qualità durante l'esecuzione del test è essenziale, in quanto l'osservazione a cura di un operatore addestrato può rilevare eventuali fattori che possono alterare i risultati, come ad esempio un *pattern* respiratorio irregolare.

Nello specifico, profondi atti inspiratori durante il *wash-out* possono riuscire a mobilizzare volumi di gas "intrappolati", mentre atti respiratori più superficiali possono determinare una maggiore pendenza della fase III della curva. Anche la presenza di sospiri durante la misurazione suggerisce l'esclusione del test dalla successiva fase di analisi dei risultati.

Nonostante l'esecuzione a volume corrente lo renda di grande interesse nell'applicazione in

ambito pediatrico, questo test presenta comunque alcune caratteristiche che potrebbero renderne difficile la tollerabilità da parte di alcuni pazienti, quali durata della misurazione, con perdita di concentrazione, epossibile *discomfort* per l'accumulo di saliva o la sensazione di secchezza alla bocca, con conseguente alterazione dei risultati.

L'uso di incentivi che indichino la corretta modalità di respirazione può essere utile e nei bambini più piccoli è raccomandato l'uso di video che possano catturarne l'attenzione, rendendo così più regolare il *pattern* del respiro. Nei lattanti le misurazioni dovrebbero essere eseguite durante le fasi di sonno non-REM, con o senza sedazione (4).

Il test deve continuare fino a quando la concentrazione di gas di fine espirazione ha raggiunto livelli inferiori a 1/40 (2.5%) rispetto alla concentrazione iniziale per almeno 3 respiri consecutivi; si deve quindi considerare il valore medio di *Lung Clearance Index* (LCI) tra due lavaggi dove le CFR registrate differiscono per meno del 10%.

Il valore di LCI rappresenta il parametro più sensibile di disomogeneità ventilatoria ed è quello più comunemente valutato negli studi condotti in età pediatrica. Esso è definito come il numero di *turnovers* del volume polmonare necessari per ripulire il polmone da un gas tracciante o dall'azoto residente e può essere calcolato come il rapporto tra volume cumulativo espirato e la CFR (5).

Nei soggetti sani, il valore di LCI oscilla tra 5 e 7, mentre tende ad aumentare in presenza di disomogeneità ventilatoria (6). Il LCI è indipendente dal sesso e resta più o meno costante durante l'infanzia e l'adolescenza; inoltre, recentemente è stata dimostrata una correlazione con le dimensioni corporee per i bambini sotto i 6 anni, per i quali sono oggi disponibili le equazioni di riferimento (7). Per quanto riguarda la variabilità della tecnica in bambini e adolescenti sani, il coefficiente di variazione (CV) del parametro LCI intra-test è buono (5.1%), la riproducibilità a breve termine è del 4.2%, mentre quella a lungo termine è del 5.1% (8).

Questi dati confermano non solo la fattibilità, ma anche la robustezza di questo parametro nel monitoraggio della funzione respiratoria in corso di patologie polmonari croniche.

L'attuabilità dell'esame si conferma buona anche in età prescolare, con valori che vanno dal 50% a 2-3 anni di età all'87% a 5-6 anni. Il CV intra-test è buono (5.2%) e la variabilità a lungo termine è inferiore a $\pm 10\%$ da un mese ad un altro (9). In un recente studio condotto su 62 bambini asmatici di età inferiore ai 7 anni, la fattibilità della tecnica MBW si limitava al 25% dei soggetti arruolati e risultava essere positivamente correlata con l'età.

Le perdite di gas ed il *pattern* respiratorio irregolare rappresentavano le principali cause di fallimento del test in questa fascia d'età.

La variabilità della CFR era inversamente associata a quella del *pattern* respiratorio, suggerendo quindi la necessità di formulare raccomandazioni specifiche per l'applicazione del MBW in età prescolare (10). Oltre all'LCI, il MBW fornisce altri due parametri indicatori di disomogeneità ventilatoria, calcolati attraverso l'analisi di progressione della pendenza della fase III della curva generata durante il *wash-out*: Sacin e Scond.

Il parametro Sacin deriva dalle differenze di distribuzione ventilatoria che si realizzano nel contesto della zona acinare e periacinare e riflette quindi la disomogeneità diffusivo/conveittivo-dipendente. Il parametro Scond riflette invece il contributo alla pendenza della curva del *wash-out* derivante dalle differenze di ventilazione nelle vie di conduzione, rappresentando dunque la disomogeneità convettivo-dipendente, ed aumenta per asincronie di flusso e ventilazione tra unità polmonari sottese dalle vie aeree prossimali ai bronchioli terminali (4).

STUDI CLINICI NELL'ASMA PEDIATRICO

Il parametro LCI è stato utilizzato con successo specialmente nel monitoraggio dei bambini con fibrosi cistica. In questi pazienti è stata ampiamente dimostrata la maggiore sensibilità del MBW rispetto alla spirometria nel rilevare le alterazioni della funzionalità polmonare (11, 12, 13).

Molto più recenti e meno numerosi sono i dati sulle applicazioni cliniche e di ricerca del MBW

nell'asma pediatrico. Nel 2001 Gustafsson *et al.* hanno dimostrato la presenza di una disomogeneità ventilatoria associata a fenomeni di *air trapping* in bambini e adolescenti con asma moderato/grave, nei quali l'applicazione della tecnica MBW permetteva di evidenziare valori significativamente più elevati di LCI e Scond rispetto ai controlli (14).

A differenza del parametro LCI, i valori di Scond persistevano elevati anche dopo la somministrazione di broncodilatatore, suggerendo in questi pazienti il preminente coinvolgimento infiammatorio delle piccole vie aeree di conduzione.

Più recentemente, Macleod *et al.* hanno condotto uno studio caso-controllo su 31 bambini con asma lieve-moderato controllato e 29 bambini sani, dimostrando che i bambini asmatici, pur presentando valori di FEV₁ sovrapponibili a quelli dei bambini sani, avevano valori di LCI e Scond significativamente più alti (15). La persistenza di valori elevati di LCI dopo broncodilatatore, a fronte di un miglioramento significativo del FEV₁, indica la presenza, in pazienti con asma controllato, di un coinvolgimento delle piccole vie aeree non evidenziabile dalla sola spirometria. Analogamente, in uno studio caso-controllo su 32 bambini con asma persistente controllato, Zwitterloot *et al.* hanno dimostrato la presenza in questi soggetti di valori basali di FEV₁, FEF₇₅ e LCI entro il *range* di normalità, mentre i valori di LCI erano significativamente più elevati rispetto ai bambini sani, anche dopo broncodilatatore (16).

Il mancato miglioramento dei valori di LCI dopo broncodilatatore in questi pazienti implica la presenza di una residua disfunzionalità delle piccole vie aeree, non evidente attraverso l'analisi delle misure spirometriche. Anche lo studio di Keen *et al.*, condotto su 47 bambini con asma lieve-moderato controllato a confronto con un gruppo controllo di 74 bambini sani, ha fornito risultati simili (17). I bambini asmatici presentavano valori di LCI, Scond e Sacin significativamente più elevati rispetto ai controlli. In particolare, quelli con test di broncoreversibilità positivo mostravano valori di Scond e di frazione esalata di ossido nitrico (FeNO) più elevati, sottolineando il ruolo dell'infiammazione come principale responsabile della disfunzione delle piccole vie aeree e suggerendo altresì la scarsa sensibilità della spirometria nel rivelare il coinvolgimento delle stesse nei bambini con asma persistente controllato. Sonnappa *et al.* hanno indagato la funzionalità respiratoria di un gruppo di 62 bambini di età prescolare con *wheezing* ricorrente, di cui 34 con forma *multi-trigger* (MTW) e 28 con forma episodica (EW), a confronto con un gruppo controllo di 72 bambini sani (18). Dai risultati è emerso che i bambini con MTW mostravano valori più alti di LCI e Scond, indipendentemente dallo stato atopico e dalla ricorrenza di sintomi negli ultimi 12 mesi. In particolare, Scond era il parametro maggiormente alterato ed entrambi miglioravano significativamente dopo broncodilatatore. Questo studio sottolinea il precoce coinvolgimento delle piccole vie aeree in bambini con MTW, dimostrando l'utilità dell'applicazione del MBW già in età prescolare. Tuttavia, sebbene l'LCI abbia mostrato una buona ripetibilità a breve e lungo termine quando valutato in soggetti sani e in soggetti con MTW, sia Scond sia Sacin non sono considerati parametri ideali per valutare la broncoreversibilità, sia a causa della grande variabilità delle misure in condizioni basali, sia per la non prevedibile miscelatura dei gas dopo inalazione del broncodilatatore. In un recente studio, solo il 16% dei bambini con *wheezing* ricorrente mostrava una bronco-reversibilità significativa del parametro Scond (19); l'inalazione del broncodilatatore, che diffonde principalmente nelle zone più ventilate del polmone, può infatti paradossalmente incrementare la già presente disomogeneità ventilatoria, rendendo l'uso dei parametri misurati con la tecnica MBW poco adatto alla valutazione della bronco-reversibilità.

Nonostante ciò, la tecnica si conferma utile nell'individuare eventuali disomogeneità della ventilazione polmonare in questa fascia di età, come dimostrato anche dal più recente studio di Lu *et al.*, dove si riscontravano valori di LCI significativamente più elevati e positivamente correlati con i valori di FeNO in bambini con *wheezing* ricorrente rispetto ai controlli, mentre nessuna differenza significativa veniva osservata per i parametri spirometrici (20).

Sono comunque necessari ulteriori studi longitudinali sull'utilità clinica di LCI e degli altri parametri di MBW prima che tali misurazioni possano essere raccomandate di *routine* nella gestione clinica del bambino asmatico.

CASO CLINICO

Giuseppe, 9 anni, è giunto presso l'ambulatorio di terzo livello di pneumo-allergologia pediatrica inviato dal pediatra di famiglia. Nell'ultimo anno ha presentato quattro episodi acuti di dispnea, di cui tre gestiti a domicilio ed uno ha necessitato di visita e trattamento urgenti presso il pronto soccorso. In questa occasione era anche associata febbre, per cui Giuseppe ha assunto un antibiotico oltre a praticare terapia con broncodilatatore e corticosteroidi inalatori (CSI) e sistemici (CSO).

Gli episodi precedenti si erano verificati in occasione di infezioni respiratorie lievi e dopo sforzo. Veniva riferita anche frequente tosse notturna.

All'anamnesi familiare emergeva la presenza di allergia alle graminacee nella madre, che si manifestava con asma e rinite. L'anamnesi fisiologica e perinatale rivelava assenza di consanguineità tra i genitori, nascita da parto eutocico a 36 settimane di età gestazionale, con peso adeguato e buon adattamento alla vita extrauterina; successivamente, allattamento artificiale con buona crescita staturo-ponderale. All'anamnesi patologica remota, Giuseppe avrebbe presentato un episodio di bronchiolite a 2 mesi di vita, con necessità di ricovero ed ossigenoterapia.

La madre riferiva comparsa di episodi di respiro sibilante a partire dal primo anno di vita, in occasione di flogosi delle vie respiratorie, trattati con terapia al bisogno (broncodilatatore e CSI), con rapida risoluzione; soltanto alcune volte sarebbe stato necessario somministrare anche CSO. Da circa 2 anni Giuseppe presentava anche dispnea da sforzo, motivo per cui non praticava alcuna attività fisica. All'esame obiettivo, il bambino presentava buone condizioni generali (peso 36 kg, 75° percentile; statura 135 cm, 50-75° percentile), eupnoico; all'auscultazione toracica si apprezzavano sibili espiratori alle basi polmonari.

Si effettuavano alcuni esami di funzionalità respiratoria; la spirometria basale mostrava un FEV₁ pari al 66% del predetto, il test di broncoreversibilità dopo somministrazione di 400 µg di salbutamolo era positivo (+17%) e i valori di misurazione del FeNO risultavano pari a 30 ppb. Considerata la familiarità, si eseguivano anche prick test per aeroallergeni, con evidenza di sensibilizzazione a dermatophagoides pteronyssinus e a graminacee.

All'anamnesi mirata non emergevano sintomi nasali o congiuntivali e la sintomatologia respiratoria non presentava stagionalità. In base all'anamnesi positiva per disturbi di tipo asmatico (in corso di flogosi delle vie respiratorie e da sforzo) e al risultato degli esami di funzionalità respiratoria, si decideva di iniziare una terapia di fondo utilizzando un farmaco di associazione (salmeterolo xinafoato, 25 µg, + fluticasone propionato, 125 µg), somministrandone due spruzzi per due volte al giorno con il distanziatore (alto dosaggio del CSI).

Alla visita di controllo, dopo 3 mesi, veniva riferito miglioramento clinico con buon controllo dei sintomi diurni, notturni e sotto sforzo, tale da permettere a Giuseppe di giocare a calcio nella squadra della scuola. La spirometria era sostanzialmente invariata nonostante il benessere soggettivo e veniva pertanto confermata la terapia di fondo in atto.

Dopo 4 mesi dall'inizio della terapia, Giuseppe ha contratto una polmonite da Mycoplasma pneumoniae e veniva ricoverato per necessità di ossigenoterapia.

Dopo 3 mesi, alla visita di controllo il bambino riferiva la ricomparsa di facile stancabilità, soprattutto durante sforzo, per cui ha dovuto interrompere l'attività sportiva.

La spirometria mostrava un FEV₁ pari al 78% del predetto ed una broncoreversibilità non significativa (+5%); si decideva di riconfermare la terapia di fondo già in corso, ma dopo 3 ulteriori mesi la situazione era sostanzialmente invariata.

In considerazione del persistere della dispnea da sforzo, pur in presenza di una spirometria solo lievemente alterata e con test di broncoreversibilità negativo, si proponeva la tecnica del MBW allo scopo di valutare meglio le piccole vie aeree.

Questa mostrava un valore di LCI pari a 8 e un valore di Scond pari a 0,04, che non si riducevano significativamente dopo broncodilatatore. Si eseguiva anche la determinazione del FeNO e della concentrazione di NO a livello alveolare (CalvNO), che risultavano essere pari rispettivamente a 25 ppb (valore massimo di normalità, 20 ppb) ed a 10 ppb (valore massimo di normalità, 10 ppb). Considerato il riscontro di una persistente infiammazione con disfunzionalità delle piccole vie aeree, si decideva di aumentare il dosaggio della componente steroidea della terapia di fondo (fluticasone propionato, 250 µg per 2 spruzzi per 2 volte/die).

Al controllo effettuato dopo un mese, Giuseppe riferiva un miglioramento significativo dei sintomi respiratori e maggiore tolleranza allo sforzo fisico; la spirometria mostrava un FEV₁ pari all'85% del predetto, con broncoreversibilità negativa, mentre i valori del FeNO esalato e di CalvNO risultavano rispettivamente pari a 12 ppb ed a 7 ppb.

Consigliavamo pertanto di proseguire la terapia inalatoria già intrapresa e programmavamo un nuovo controllo a distanza di 2 mesi per una rivalutazione funzionale mediante spirometria ed MBW, nell'ottica di rimodulare la terapia e, se possibile, ridurre il dosaggio dei CSI.

CONCLUSIONI

Lo studio del coinvolgimento delle piccole vie aeree rappresenta un ambito di ricerca clinica di grande attualità e può fornire informazioni importanti per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici dell'asma in età pediatrica. Tale valutazione fisiopatologica mirata è inoltre utile ad individuare quanto più precocemente possibile il danno a livello delle vie aeree periferiche, che può contribuire al deterioramento della funzione respiratoria già in età pediatrica. Sono auspicabili ulteriori studi in questo ambito, in considerazione della peculiare importanza che una valutazione clinica e funzionale integrata assume nella gestione dei bambini con asma persistente sottoposti a regimi terapeutici con alte dosi di cortisonici inalatori.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Global Initiative for Asthma (GINA). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. Last Update 2018. Available at: www.ginasthma.org
- (2) La Grutta S, Ferrante G. *La spirometria nel bambino collaborante*. *Pneumologia Pediatrica* 2016; 16: 22-29.
- (3) Paull K, Covar R, Jain N, et al. *Do NHLBI lung function criteria apply to children? A cross-sectional evaluation of childhood asthma at National Jewish Medical and Research Center, 1999-2002*. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 311-317.
- (4) Robinson PD, Latzin P, Verbanck S, et al. *Consensus statement for inert gas washout measurement using multiple- and single- breath tests*. *Eur Respir J* 2013; 41: 507-522.
- (5) Horsley A. *Lung clearance index in the assessment of airways disease*. *Respir Med* 2009; 103: 793-799.
- (6) Fuchs O, Latzin P, Thamrin C, et al. *Normative data for lung function and exhaled nitric oxide in unselected healthy infants*. *Eur Respir J* 2011; 37: 1208-1216.
- (7) Lum S, Stock J, Stanojevic S, et al. *Age and height dependence of lung clearance index and functional residual capacity*. *Eur Respir J* 2013; 41: 1371-1377.
- (8) Fuchs SI, Eder J, Ellemunter H, et al. *Lung clearance index: normal values, repeatability, and reproducibility in healthy children and adolescents*. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44: 1180-115.
- (9) Rosenfeld M, Allen J, Arets BH, et al. *An official American Thoracic Society workshop report: optimal lung function tests for monitoring cystic fibrosis, bronchopulmonary dysplasia, and recurrent wheezing in children less than 6 years of age*. *Ann Am Thorac Soc* 2013; 10: 1-11.
- (10) Yammine S, Summermatter S, Singer F, et al. *Feasibility of nitrogen multiple-breath washout in inexperienced children younger than 7 years*. *Pediatr Pulmonol* 2016; 51: 1183-1190.
- (11) Subbarao P, Milla C, Aurora P, et al. *Multiple-breath washout as a lung function test in cystic fibrosis. A Cystic Fibrosis Foundation Workshop Report*. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12: 932-939.
- (12) Aurora P, Bush A, Gustafsson P, et al. *Multiple-breath washout as a marker of lung disease in pre-school children with cystic fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 249-256.
- (13) Vermeulen F, Proesmans M, Boon M, et al. *Lung clearance index predicts pulmonary exacerbations in young patients with cystic fibrosis*. *Thorax* 2014; 69: 39-45.
- (14) Gustafsson PM. *Peripheral airway involvement in CF and asthma compared by inert gas washout*. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42: 168-176.
- (15) Macleod KA, Horsley AR, Bell NJ, et al. *Ventilation heterogeneity in children with well controlled asthma with normal spirometry indicates residual airways disease*. *Thorax* 2009; 64: 33-37.
- (16) Zwitserloot A, Fuchs SI, Müller C, et al. *Clinical application of inert gas Multiple Breath Washout in children and adolescents with asthma*. *Respir Med* 2014;108: 1254-1259.
- (17) Keen C, Olin AC, Wennergren G, et al. *Small airway function, exhaled NO and airway hyper-responsiveness in paediatric asthma*. *Respir Med* 2011; 105: 1476-1484.
- (18) Sonnappa S, Bastardo MC, Wade A, et al. *Symptom-pattern phenotype and pulmonary function in preschool wheezers*. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 519-526.
- (19) Sonnappa S, Bastardo CM, Wade A, et al. *Repeatability and bronchodilator reversibility of lung function in young children*. *Eur Respir J* 2013; 42: 116-124.
- (20) Lu Z, Foong RE, Kowalik K, et al. *Ventilation inhomogeneity in infants with recurrent wheezing*. *Thorax* 2018 Jun 15. pii: [thoraxjnl-2017-211351](https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-211351).

La genetica molecolare: casi clinici per imparare

Molecular genetics: learning through case reports

Federica Porcaro¹, Carlo De Pieri²

¹ *UOC di Broncopneumologia, Dipartimento Pediatrico Universitario Ospedaliero, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma*

² *Clinica Pediatrica, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Udine, Udine.*

Corrispondenza: Federica Porcaro; **email:** federica.porcaro@opbg.net, carlodepieri@gmail.com

Riassunto Sebbene il percorso diagnostico delle malattie trovi il suo principale fondamento nella raccolta dei dati anamnestici e nella valutazione clinica del paziente, esso si completa mediante l'esecuzione di indagini più dettagliate, specie nell'inquadramento delle malattie su base genetica.

La genetica molecolare definisce quella branca della medicina che si occupa dello studio della struttura e del funzionamento dei geni a livello molecolare. Tale settore scientifico, oramai in rapida evoluzione, si avvantaggia dello sviluppo di tecnologie sempre più sensibili ed affidabili, oltre che della conoscenza sempre più approfondita della struttura, organizzazione e funzione degli acidi nucleici. Descriviamo, di seguito, il caso di una bambina di 5 mesi, giunta alla nostra osservazione per un quadro clinico caratterizzato da difficoltà nell'alimentazione, scarso accrescimento staturo-ponderale e tachipnea. Al termine dell'iter diagnostico, è stata posta diagnosi di proteinosi alveolare, supportata dalla rilevazione di una mutazione specifica a carico del gene *MARS* (*methionyl transfer RNA synthetase*).

Parole chiave: malattie genetiche, marcatore molecolare, analisi molecolare, citogenetica molecolare, proteinosi alveolare, gene *MARS*.

Summary: Although the collection of clinical history and physical examination of a patient is very important in the diagnostic workup of diseases, the execution of more detailed investigations is necessary especially in the definition of genetic diseases.

Molecular genetics is the branch of medicine that assesses structure, organization and function of genes at a molecular level. Its rapid evolution is due to the development of sensitive and reliable technologies, as well as an increasingly improved knowledge of structure, organization and function of nucleic acids.

We herein describe the case of a 5-month-old child with feeding difficulties, failure to thrive and tachypnoea, who underwent multiple diagnostic procedures and was diagnosed as having alveolar proteinosis, confirmed by the detection of a mutation in *MARS* (*methionyl transfer RNA synthetase*) gene.

Keywords: genetic diseases, molecular marker, molecular analysis, molecular cytogenetics, alveolar proteinosis, *MARS* gene.

INTRODUZIONE

La raccolta dei dati anamnestici e l'accurata valutazione clinica ricoprono un ruolo di primaria importanza nel percorso diagnostico delle malattie genetiche, il cui completamento, spesso, culmina nell'esecuzione dei test genetici. Per test genetico s'intende l'analisi di DNA, RNA, cromosomi, proteine, metaboliti o altri prodotti genici volta ad identificare cariotipi, genotipi, mutazioni o fenotipi correlati o meno con patologie ereditabili umane (1).

Allo stato attuale sono disponibili indagini biochimiche, molecolari o citogenetiche in grado di definire il difetto genetico e, quindi, di confermare il sospetto clinico in epoca pre- e post-natale, oltre che in fase pre-sintomatica in quei soggetti considerati a rischio.

Tuttavia, i campi di applicazione della *genetica* e della *genomica* sono ben più ampi, in quanto in grado di fornire utili informazioni in merito alla variabilità dell'espressione genica, alle relazioni evoluzionistiche tra l'uomo e gli altri organismi viventi, all'identificazione delle correlazioni tra l'informazione contenuta nel genoma e la suscettibilità/predisposizione alle malattie e alla soggettività della risposta clinica alla somministrazione di farmaci (*farmacogenomica*). Ne deriva, dunque, il sempre più crescente interesse della comunità scientifica nei confronti

di tali metodiche diagnostiche e del loro ruolo nella pratica clinica negli ultimi decenni. In relazione alla malattia genetica sospettata, gli studi di laboratorio disponibili includono le seguenti tipologie di indagini: biochimiche (dosaggi enzimatici), molecolari (analisi del DNA e dell'RNA), citogenetiche (analisi dei cromosomi) (2). Poiché la trattazione delle indagini biochimiche esula dallo scopo della presente trattazione, di seguito saranno esaminate le principali tecniche di diagnostica molecolare e di citogenetica molecolare. Le analisi di diagnostica molecolare si servono di tecniche sofisticate che richiedono l'utilizzo di particolari enzimi (enzimi di restrizione, retro-trascrizione e amplificazione), necessari per l'analisi degli acidi nucleici (DNA e RNA), previa estrazione cellulare. Esse consentono di definire le basi biologiche di diverse malattie, nonché di identificare specifiche sequenze/geni tramite l'impiego di sonde molecolari.

Le analisi di citogenetica molecolare necessitano, invece, dell'utilizzo di sostanze coloranti al fine di rilevare regioni cromosomiche a diverse intensità di colorazione su colture di linfociti prelevati da sangue periferico. I cromosomi così bandeggiati, suddivisi e classificati secondo una nomenclatura standardizzata, permettono l'identificazione di alterazioni numeriche e strutturali delle singole unità del genoma.

Poiché le suddette indagini sono in grado di fornire informazioni diagnostiche, terapeutiche e prognostiche, esse trovano oramai impiego routinario nella diagnostica dei disordini ereditari e delle malattie associate a mutazioni somatiche.

PRINCIPALI TECNICHE DI DIAGNOSTICA MOLECOLARE

L'analisi del genoma mediante marcatori molecolari è in grado di rilevare i polimorfismi tra individui diversi appartenenti alla stessa specie. Le differenze rilevate a livello di una specifica sequenza nucleotidica del DNA costituiscono un insieme di marcatori genetici con elevate potenzialità discriminanti e rappresentano un valido sistema di analisi comparativa dei genomi. L'identificazione e l'isolamento di numerosi enzimi (enzimi di restrizione e polimerasi) in grado di rilevare il marcatore molecolare tramite la digestione degli acidi nucleici, nonché la messa a punto di precise tecniche elettroforetiche di separazione (*Southern Blot* e *Northern Blot*) ed amplificazione degli acidi nucleici (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), hanno reso possibile l'analisi della struttura e della funzione del materiale genetico (3).

Si definisce marcatore molecolare quel *locus* genomico rilevabile con sonde o inneschi specifici e che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in maniera caratteristica ed inequivocabile il tratto cromosomico con cui si identifica. Pertanto, i marcatori molecolari si basano direttamente sulla rilevazione di differenze nella sequenza nucleotidica del DNA che costituiscono il patrimonio ereditario di ciascun individuo. Tali polimorfismi possono essere la conseguenza di mutazioni quali inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni o mutazioni puntiformi.

Attualmente sono disponibili diversi marcatori molecolari, che trovano largo impiego quale strumento di indagine estremamente efficace ed affidabile (3).

I sistemi molecolari per l'analisi del polimorfismo genomico si differenziano per:- il tipo di sequenze analizzate;

- il tipo di *locus* analizzato (marcatore multi-*locus*: analisi simultanea di molti *loci* genomici che implicano l'amplificazione di tratti cromosomici casuali con inneschi oligonucleotidici a sequenza nota arbitraria; marcatore singolo-*locus*: ibridazione o amplificazione di tratti cromosomici a sequenza nota mediante l'utilizzo di sonde o inneschi specifici per determinati *loci*);

- il tipo di tecnologia impiegata nei processi di separazione ed amplificazione degli acidi nucleici (tecniche d'ibridazione *Southern blot*, tecniche d'ibridazione *Northern blot* e amplificazione polimerasica a catena).

La disponibilità degli acidi nucleici rappresenta una premessa necessaria per qualsiasi procedura di diagnostica molecolare (3).

Il procedimento di estrazione del DNA richiede anzitutto la disgregazione della membrana cellulare (plasmatica e nucleare) mediante l'utilizzo di sostanze detergenti, coadiuvate da ausili meccanici.

Il lisato cellulare viene poi trattato con proteasi al fine di inattivare le proteine contaminanti la preparazione degli acidi nucleici. L'incubazione con proteasi ed enzimi in grado di degradare specificatamente l'RNA (RNasi) permette l'isolamento del DNA, che successivamente viene estratto utilizzando fenolo e cloroformio. Il DNA in fase acquosa – precipitato con sodio acetato ed etanolo assoluto, visibile sotto forma di un "gomitolo" biancastro – è recuperato dopo centrifugazione. Le tecniche *Southern blot* e *Northern blot* rappresentano due metodologie di comune impiego nella genetica molecolare per l'elettroforesi e l'ibridazione rispettivamente del DNA e dell'RNA (3). Le informazioni derivanti dall'utilizzo della tecnica *Southern blot* includono: 1) la rilevazione della presenza o assenza di uno specifico frammento di DNA; 2) la rilevazione della posizione dei siti di restrizione attraverso la stima delle dimensioni dei frammenti di DNA; 3) la valutazione del numero di copie di un determinato frammento di DNA attraverso la comparazione con un campione normale.

La procedura, che richiede primariamente l'isolamento del DNA genomico attraverso il procedimento di estrazione sopra descritto, si avvale di enzimi di restrizione che digeriscono il DNA in siti specifici (siti di restrizione) ad una temperatura costante (37°C). I frammenti di DNA così ottenuti sono poi sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio e successiva colorazione con bromuro di etidio (molecola intercalante gli acidi nucleici). I frammenti di DNA così ottenuti, il cui peso molecolare è determinato per confronto con frammenti di DNA con peso molecolare noto, sono trasferiti su filtro di nitrocellulosa a cui è aggiunta una sonda radioattiva che ibriderà qualsiasi frammento di DNA complementare. Tale metodica permette di identificare con precisione la localizzazione dei siti di riconoscimento degli enzimi utilizzati, ottenendo dunque una mappa di restrizione. Una metodica simile alla precedente e sviluppata per l'analisi dell'RNA è la tecnica *Northern blot*. L'informazione derivante dall'utilizzo di questa metodologia consiste nella definizione dell'espressione genica attraverso la rilevazione delle dimensioni dell'mRNA codificato da un gene. In tal caso, le molecole di RNA estratte dalle cellule sono separate in relazione alle loro dimensioni su gel di agarosio e trasferite su filtro di nitrocellulosa. Dopo l'ibridazione con una sonda marcata e l'uso della tecnica di rilevazione appropriata, le bande indicheranno la localizzazione delle specie di RNA complementari con la sonda.

La scoperta della reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) da parte di Muller et al. (1986) ha di fatto consentito la messa a punto di nuovi marcatori molecolari (4).

Tale metodica permette la sintesi ripetuta *in vitro* e per via enzimatica di uno o più specifici segmenti di DNA localizzati tra due sequenze nucleotidiche note.

Dopo una serie di fasi di denaturazione del DNA, ibridazione con gli inneschi (o *primer*) e polimerizzazione dei nuovi filamenti, è possibile ottenere la produzione di un numero elevato di copie di specifiche sequenze di DNA. La PCR prevede l'utilizzo di un termociclatore in grado di realizzare ripetuti cicli termici. All'inizio di ogni ciclo termico il DNA genomico è sottoposto a denaturazione mediante riscaldamento (93-95°C). In seguito, in ragione delle caratteristiche termodinamiche dei *primer* impiegati, si procede al rapido raffreddamento (37-55°C) della reazione che permette l'ibridazione dei *primer* con le sequenze complementari del DNA stampo. Al termine della reazione, seguirà l'adeguamento della temperatura al valore necessario perché l'enzima DNA polimerasi possa catalizzare la sintesi di nuovi filamenti di DNA complementari a quello stampo (72°C). La reazione di amplificazione degli acidi nucleici sostenuta dalla DNA polimerasi rappresenta la chiave di volta del sequenziamento Sanger, tecnica di genetica molecolare utilizzata per lo svolgimento del caso clinico descritto di seguito. In biologia molecolare, si definisce sequenziamento il processo volto alla determinazione dell'esatta sequenza di basi che prendono parte alla costituzione del frammento di DNA in analisi. Sino ad ora la metodica maggiormente utilizzata – anche definita "metodo della terminazione della catena" – si basa su una strategia enzimatica sviluppata da Frederick Sanger (1977). Il sequenziamento Sanger è definito "enzimatico" poiché prevede l'utilizzo di un enzima, la DNA polimerasi, che, iniziando da un *primer* complementare alla regione del DNA stampo, utilizza i quattro deossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) per allungare la catena (3). Nella reazione di sequenziamento, oltre ai deossinucleotidi normali, vengono impiegati nucleotidi modificati (di-deossitri-fosfato,

ddNTPs) per interrompere la reazione di sintesi in posizioni specifiche (metodo della terminazione della catena). I ddNTPs sono molecole artificiali corrispondenti ai nucleotidi naturali, che si differenziano per l'assenza del gruppo OH sul carbonio 3' dello zucchero. Tale modifica della struttura nucleotidica impedisce la formazione di legami fosfodiesterici (*DNA chain terminator*), comportando la terminazione della reazione di allungamento della catena nucleotidica.

Il campione di DNA da sequenziare viene, dunque, suddiviso in quattro reazioni separate, ognuna delle quali contiene, oltre al DNA stampo, un frammento corto di DNA a singolo filamento e complementare all'estremità 3' del DNA (*primer*), la DNA polimerasi e i quattro deossinucleotidi.

A ciascuna di queste reazioni viene, tuttavia, aggiunto soltanto uno dei quattro ddNTPs marcati con isotopo radiattivo (o con fluorocromi) in quantità stechiometricamente inferiore ai deossinucleotidi per permettere un'elongazione del filamento sufficiente per l'analisi.

L'incorporazione di un ddNTP lungo il filamento di DNA in estensione ne causa la terminazione prima del raggiungimento della fine della sequenza di DNA stampo.

Tale reazione dà origine ad una serie di frammenti di DNA di lunghezza variabile, interrotti in corrispondenza dell'incorporazione del ddNTP casualmente integrato dalla polimerasi. In seguito, le quattro reazioni saranno fatte correre su gel di poli-acrilammide, dove i frammenti, che potranno differire anche di una singola base, saranno separati in relazione alla loro lunghezza. I frammenti saranno poi visualizzati su lastra fotografica come bande scure, la cui sequenza sarà letta dal basso verso l'alto. Oggigiorno, tuttavia, sono impiegati dei sequenziatori automatici in grado di usare tutti i ddNTPs, marcati con quattro coloranti fluorescenti differenti (fluorocromi), all'interno di un'unica reazione. Ogni filamento di DNA emetterà una luce di colore diverso in base al ddNTP con il quale terminerà; le fluorescenze rilevate tramite un sensore posto alla fine del capillare delineeranno delle curve di assorbimento (ciascuna per ogni ddNTP), chiamate ferogrammi.

PRINCIPALI TECNICHE DI CITOGENETICA MOLECOLARE

L'analisi citogenetica convenzionale include lo studio del cariotipo (insieme dei cromosomi metafasici), l'ibridazione *in situ* di fluorescenza (*Fluorescence In Situ Hybridization, FISH*) e l'ibridazione genomica comparativa dell'*array* (*array Comparative Genomic Hybridization, aCGH*). Tali metodiche prevedono lo studio microscopico dei 23 cromosomi umani, consentendo l'identificazione di aneuploidie, oltre che di eventuali aberrazioni cromosomiche ricorrenti, siano esse caratterizzate dalla perdita netta o dall'aggiunta di materiale genetico (traslocazioni definite "sbilanciate") o dall'assenza di tali condizioni (traslocazioni "bilanciate").

Tuttavia, soltanto le ultime due metodiche sono propriamente considerate quali tecniche di citogenetica molecolare, poiché in grado di rilevare anomalie che sono al di sotto della risoluzione dell'analisi cromosomica. L'analisi della morfologia e del bandeggio dei singoli cromosomi deriva dalla possibilità di utilizzare specifiche sonde oligonucleotidiche di DNA ad alta omologia. Tali sonde, marcate con colorazione citochimica (colorazione *Giemsa* o *reverse*) o fluorescente (colorazione con quinacrina), permettono l'identificazione di determinate sequenze bersaglio su cromosomi metafasici o interfasici. Tuttavia, l'impiego delle suddette metodiche era inizialmente vincolato al numero minimo e standardizzato di 20 metafasi. In ragione della variabilità dell'indice di proliferazione cellulare e dunque dell'impossibilità di ottenere il numero minimo di metafasi richiesto per l'esecuzione dell'analisi – data anche la presenza di anomalie citogenetiche ricorrenti – in molti laboratori si è proceduto ad impiegare tecniche in grado di sfruttare il grande numero di interfasi per stimare egualmente alcune possibili anomalie.

La FISH rappresenta una tecnica per l'approfondimento e la verifica diagnostica del cariotipo (5). Una sonda fluorescente – costituita di una specifica sequenza di DNA realizzata *in vitro* con l'inclusione di nucleotidi fluorescenti – viene fatta ibridare con i cromosomi parzialmente

denaturati. Dopo la separazione delle eliche, la sonda si appaierà solo sul tratto di cromosoma contenente la sequenza di DNA complementare, che dunque emetterà un segnale fluorescente. Alterazioni nella posizione del segnale rispetto a quella attesa in un corredo cromosomico normale indicheranno un possibile ri-arrangiamento.

La FISH è generalmente utilizzata per “indagini mirate”, basate su una specifica indicazione clinica. Ciò limita l'applicazione di questa tecnica, poiché in molti casi i fenotipi patologici non sono riconducibili a sindromi note. La CGH consente, invece, il rilevamento di amplificazioni e delezioni di regioni ancora più piccole di DNA all'interno dei cromosomi (6).

La tecnica prevede il confronto del contenuto genomico (DNA) di un paziente con uno o più individui di controllo considerati normali.

Durante il processo analitico i DNA vengono marcati con due differenti sostanze fluorescenti; si è soliti utilizzare il fluorocromo rosso per il DNA da testare ed il fluorocromo verde per il DNA di controllo. I due DNA marcati sono mescolati in parti uguali e, dopo un'opportuna purificazione, ibridati sulla piattaforma *array*. Dopo opportuni lavaggi post-ibridazione, si procede alla rilevazione dell'intensità dei segnali fluorescenti emessi dalle sonde. Ogni sonda della piattaforma rappresenta una specifica regione del genoma umano e quanto più è elevato il numero di sonde, tanto maggiore è l'efficacia dell'*array* nell'identificazione delle variazioni del numero di copie.

La misurazione dell'intensità della fluorescenza emessa dai DNA ibridati sull'*array* e la loro comparazione permettono di evidenziare variazioni del numero di copie presenti nel DNA testato.

Attualmente sono disponibili diverse tipologie di piattaforme *array*-CGH: i *BAC-arrays* e gli *oligo-arrays*. I primi, considerati *arrays* di vecchia generazione, contengono un numero piuttosto limitato di sonde, la cui specificità e il cui potere di risoluzione sono inficiati dalle loro grandi dimensioni (circa 160.000 paia di basi). I secondi, invece, possiedono un numero molto più elevato di sonde, le cui piccole dimensioni (da 20 a 100 basi) garantiscono una maggiore risoluzione ed accuratezza nella definizione delle anomalie del DNA, con elevata specificità.

CASO CLINICO

Lashwana è una bambina di 5 mesi di nazionalità francese, nata a Maiotta, isola facente parte dell'arcipelago Comore nell'Oceano Indiano, e che è giunta alla nostra attenzione per difficoltà nell'alimentazione e arresto della crescita staturo-ponderale. L'esordio dei sintomi risaliva ai primi due mesi di vita, a seguito di un'infezione respiratoria virale accompagnata da rinite e candidosi orale.

La bambina era nata a termine dopo gravidanza normo-decorsa ed il periodo peri- e post-natale era stato regolare e senza menzione di *distress* respiratorio neonatale. Poiché non si registrava l'incremento ponderale atteso nonostante l'ottimizzazione degli apporti calorici tramite la nutrizione enterale, veniva avviato un bilancio eziologico esteso. In particolare, lo studio della funzionalità epatica, renale e tiroidea, il test del sudore e lo screening metabolico (profilo delle acil-carnitine e dosaggio di ammoniemia, alfa-1 anti-tripsina, lattati e CPK) ed immunologico (sottopopolazioni linfocitarie e dosaggio delle immunoglobuline sieriche) erano nella norma.

L'ecocardiogramma mostrava la persistenza di un piccolo difetto interatriale di 3 mm di diametro, non emodinamicamente significativo, mentre l'ecografia addominale evidenziava un'epatomegalia omogenea. Al fine di escludere un quadro di malassorbimento intestinale, veniva eseguita l'esofago-gastro-duodeno-scopia con biopsie multiple, che tuttavia non risultavano diagnostiche.

Dopo circa due mesi la bambina era nuovamente rivalutata in ragione della persistenza dello scarso accrescimento. L'esame clinico mostrava la presenza di tachipnea (90-100 atti respiratori/minuto) e l'esame radiografico del torace evidenziava un quadro compatibile con interstiziopatia polmonare (figura 1), in seguito confermata dalla tomografia computerizzata (TC) (figura 2).

La broncoscopia flessibile con lavaggio bronco-alveolare (BAL) evidenziava la presenza di abbondante materiale lipo-proteinaceo (figura 3).



Fig. 1: Radiografia del torace all'esordio della sintomatologia. Quadro compatibile con interstiziopatia.

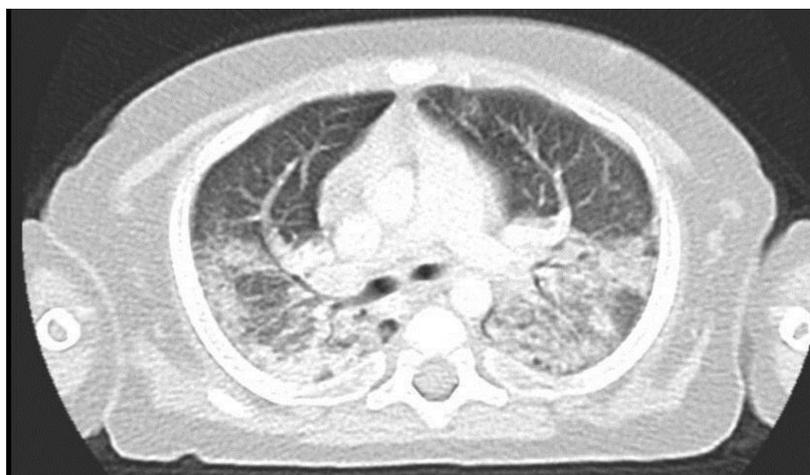


Fig. 2: Tomografia computerizzata all'esordio. È possibile notare la concentrazione maggiore delle lesioni nelle aree declivi del polmone

Dalla raccolta anamnestica familiare emergeva una storia di morte di due fratelli materni in epoca neonatale per cause non meglio precisate. Sebbene il BAL fosse di per sé diagnostico per proteinosi alveolare, unitamente all'origine geografica dei genitori e della bambina ed alla storia familiare suggestiva, si poneva tuttavia l'indicazione all'esecuzione di indagini genetiche tramite tecnica di sequenziamento Sanger, che permetteva l'identificazione di due mutazioni – c.1177G>A (p.Ala393Thr) e c1700C>T (p.Ser567Leu) – in omozigosi sul gene MARS. I genitori, anch'essi sottoposti ad approfondimenti genetici, risultavano portatori in eterozigosi delle stesse mutazioni.

DISCUSSIONE

La proteinosi alveolare è una malattia caratterizzata dall'accumulo di materiale lipoproteico all'interno degli alveoli (7). Il disordine, descritto tanto nella popolazione pediatrica quanto negli adulti, può presentare diverse cause eziopatogenetiche.

Sebbene le forme diagnosticate nel paziente adulto siano più frequentemente sostenute da reazioni autoimmunitarie caratterizzate dalla produzione di anticorpi contro il recettore per il GM-CSF (*granulocyte monocyte - colony stimulating factor*), le forme geneticamente determinate sono di maggiore riscontro in età pediatrica (8).

L'avanzamento delle tecniche di diagnostica molecolare ha permesso una migliore definizione genotipica della malattia attraverso la rilevazione di mutazioni a carico dei geni codificanti le proteine coinvolte nella sintesi e nel metabolismo del surfactante.

In ragione della molteplicità dei geni coinvolti, l'espressività fenotipica e dunque la prognosi appaiono alquanto variabili. Le forme più note vedono il coinvolgimento dei geni che codificano le proteine B e C del surfactante (geni *SFTPB* e *SFTPC*) (9, 10) o le proteine coinvolte nel metabolismo dello stesso (gene *ABCA3* *adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette protein family*) (11). Tuttavia, altri difetti genetici possono alterare i processi di trascrizione delle proteine del surfactante (mutazioni del gene *TTF-1*, *Thyroid transcription factor-1*) (12), di trasporto degli aminoacidi cationici implicati nella sua sintesi (mutazioni del gene *SLC7A7* responsabili della *lysine intolerance*) (13) e di sintesi delle catene α e β del recettore per il GM-CSF (14).



Fig. 3: Liquido di lavaggio bronco-alveolare ottenuto da lavaggio terapeutico del polmone (*whole lung lavage*)

Quest'ultimo rappresenta, inoltre, il bersaglio degli anticorpi prodotti nelle forme autoimmuni tipiche dell'adulto, caratterizzate da un'attività deficitaria del macrofago alveolare coinvolto nel metabolismo e nel riciclo cellulare del surfactante polmonare.

Diversamente, le forme secondarie risultano più spesso associate a linfoma ed altre malattie linfoproliferative, infezioni (*Nocardia* o *M. tuberculosis*) o esposizione ad agenti chimici irritanti (15). Il caso clinico sopra riportato, descrive l'eziologia genetica della malattia come dimostrato dalla mutazione rilevata a carico del gene *MARS*, codificante la tRNA-metionil-sintetasi (16).

La trasmissione della malattia, per la quale è descritta una particolare distribuzione geografica poiché peculiare dell'Isola della Réunion, presuppone l'effetto fondatore e la recessività trasmissiva. L'analisi di 34 casi osservati in un arco temporale di 42 anni ha permesso di precisare le caratteristiche cliniche, biologiche, radiologiche ed evolutive di questa forma particolare di proteinosi alveolare (17). Le manifestazioni respiratorie esordiscono in epoca precoce, generalmente entro i primi 3 mesi di vita, e sono accompagnati da arresto della crescita staturale-ponderale in circa il 90% dei casi. L'iper-transaminasemia, espressiva del coinvolgimento epatico, risulta altrettanto frequente, così come il quadro di flogosi sistemica, testimoniata dall'incremento dei livelli di proteina C reattiva, dall'anemia sideropenica, dalla trombocitosi e dall'ipergammaglobulinemia (18). In tali pazienti la TC del torace senza mezzo di contrasto mostra un quadro di aspetto a vetro smerigliato, riempimento alveolare e *crazy paving* prevalentemente localizzato nelle aree declivi, con un doppio gradiente antero-posteriore e supero-inferiore (18).

Il lavaggio bronco-alveolare assolve alla duplice funzione diagnostica e terapeutica poiché in grado di offrire dei miglioramenti clinici consistenti, quali lo svezzamento dall'ossigeno e la ripresa della crescita ponderale nel breve e medio termine. Tuttavia, tale miglioramento clinico non influisce sulla sopravvivenza globale, poiché il 67% dei casi evolve verso un quadro di fibrosi polmonare.

In tali casi prevale l'aspetto radiologico, caratterizzato da immagini reticolari, microcisti sub-pleuriche, ovvero lungo il decorso dei setti e gli assi bronco-vascolari, che delineano il quadro radiologico classico definito "a nido d'ape", con associate bronchiectasie da trazione (18).

Sebbene i meccanismi sottostanti l'evoluzione fibrotica non siano ancora noti, la prognosi rimane severa in circa il 60% dei casi, poiché il decesso può avvenire entro i 2 anni di vita ovvero nelle epoche successive in relazione alla severità della fibrosi polmonare (18).

Sebbene il trapianto polmonare possa rappresentare un'opzione terapeutica, in letteratura sono stati descritti soltanto 4 casi per i quali si è tentato il trapianto polmonare: 3 di essi sono deceduti nell'immediato periodo peri-operatorio, mentre un paziente è andato incontro ad *exitus* dopo circa due anni dal trapianto probabilmente a seguito della ripresa della malattia sul polmone impiantato (18).

CONCLUSIONI

Le tecniche di biologia molecolare costituiscono il principale ambito di applicazione dei risultati della ricerca di base svolta in campo biologico-molecolare e biomedico.

Il sequenziamento del DNA è oggi una metodica routinaria grazie alla quale è possibile sequenziare migliaia di nucleotidi. Sequenze complete per migliaia di geni di microrganismi, piante e animali (incluso l'uomo) sono al momento disponibili e banche dati informatiche sono state messe a punto per conservare ed analizzare le informazioni di sequenza. Sempre più frequentemente il sequenziamento è stato, altresì, applicato non soltanto sui singoli geni, ma su interi genomi. Ne deriva, pertanto, il sempre più crescente interesse della comunità scientifica nei confronti di quelle tecniche che permettono di ottenere una conoscenza dettagliata del genoma umano. Tali conoscenze permettono certamente una migliore definizione diagnostica di entità nosologiche rare, nonché la loro presa in carico e la formulazione prognostica anche in termini di *counselling* genetico per le famiglie. Oltre a ciò, potrebbero consentire – mediante la tecnologia del DNA ricombinate – di modificare determinati geni con il preciso intento di correggere le malattie intervenendo sui tessuti malfunzionanti.

Ringraziamenti: Si ringrazia l'equipe medica del reparto di Pneumologia ed Allergologia dell'ospedale pediatrico Necker Enfant Malades dove il caso clinico è stato osservato ed in particolare il dottor David Drummond per la disponibilità. Si ringrazia inoltre l'ERS *Clinical Training Fellowship* per il supporto.

GLOSSARIO

Genetica: scienza che studia i singoli geni.

Genomica: disciplina che esamina l'insieme dei geni nell'ambito di uno specifico genoma.

Farmacogenomica: determinazione ed analisi del DNA e dei suoi prodotti allo scopo di correlare queste informazioni con la risposta (cellulare, tissutale ed individuale) ad un farmaco.

Polimorfismo: differenza in regioni omologhe tra individui diversi appartenenti alla stessa specie. Per convenzione, si considerano polimorfismi genetici solo le forme che si presentano con una frequenza maggiore dell'1%. *Locus* genomico: frammento di DNA compreso tra due regioni oligonucleotidiche note.

Inserzione: mutazione che si caratterizza per l'inclusione di nucleotidi aggiuntivi ad un certo livello della sequenza del DNA.

Delezione: mutazione che si caratterizza per la perdita di una porzione di genoma di dimensioni variabili (singolo nucleotide, uno o più geni oppure segmento di cromosoma).

Traslocazione: aberrazione cromosomica strutturale che consiste nel trasferimento di un segmento di cromosoma ad un cromosoma diverso.

Duplicazione: aberrazione cromosomica consistente nella duplicazione di un segmento di un cromosoma, che quindi è presente due volte all'interno del genoma aploide.

Mutazione puntiforme: mutazione consistente in un'alterazione (sostituzione, delezione o inserzione) di una singola coppia di basi del DNA.

Primer: corta sequenza nucleotidica sintetizzata in laboratorio, complementare al DNA da amplificare.

Aneuploidia: alterazione cromosomica numerica.

Metafase: periodo del ciclo cellulare in cui i cromosomi si distribuiscono al centro della cellula formando la piastra equatoriale.

Interfase: periodo del ciclo cellulare che intercorre tra una mitosi e la successiva.

Array: supporto di vetro o plastica la cui superficie è coperta da frammenti di DNA comunemente chiamati "sonde".

BIBLIOGRAFIA

- (1) Harper PS. *What do we mean by genetic testing?* J Med Genet 1997; 34: 749-752.
- (2) Strachan T, Read AP. *Human molecular genetics*. 4th ed. ed. United States: New York : Garland Science/Taylor & Francis Group 2011; 569-604.
- (3) Becker WM KL, Hardin J. *Il Mondo Della Cellula*. Napoli: Edises 2007; 9: 171-201
- (4) Templeton NS. *The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 1992; 1: 58-72. Epub
- (5) van Ommen GJ, Breuning MH, Raap AK. *FISH in genome research and molecular diagnostics*. Current opinion in genetics & development. 1995; 5: 304-308.
- (6) Aradhya S, Cherry AM. *Array-based comparative genomic hybridization: clinical contexts for targeted and whole-genome designs*. Genetics in medicine. Am College MedGen J 2007; 9: 553-559.
- (7) Hamvas A, Cole FS, Nogee LM. *Genetic disorders of surfactant proteins*. Neonatol. 2007; 91: 311-317.
- (8) Suzuki T, Trapnell BC. *Pulmonary Alveolar Proteinosis Syndrome*. Clinics in chest medicine. 2016; 37: 431-440.
- (9) Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, et al. *Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis*. New Engl Med J 1993; 328: 406-410.10. Thouvenin G, Abou Taam R, Flamein F, et al. *Characteristics of disorders associated with genetic mutations of surfactant protein C*. Arch Dis Child 2010; 95 :449-454.
- (10) Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, et al. *ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency*. New Engl Med J 2004; 350: 1296-1303.
- (11) Hamvas A, Deterding RR, Wert SE, et al. *Heterogeneous pulmonary phenotypes associated with mutations in the thyroid transcription factor gene NKX2-1*. Chest 2013; 144: 794-804.
- (12) Santamaria F, Brancaccio G, Parenti G, et al. *Recurrent fatal pulmonary alveolar proteinosis after heart-lung transplantation in a child with lysinuric protein intolerance*. J Ped 2004; 145: 268-272.
- (13) Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, et al. *Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression*. Clin Investigat J 1997; 100: 2211-2217.
- (14) Wang BM, Stern EJ, Schmidt RA, et al. *Diagnosing pulmonary alveolar proteinosis. A review and an update*. Chest 1997; 111: 460-466.
- (15) Hadchouel A, Wieland T, Griese M, et al. *Biallelic Mutations of Methionyl-tRNA Synthetase Cause a Specific Type of Pulmonary Alveolar Proteinosis Prevalent on Reunion Island*. Am J Hum Gen 2015; 96: 826-831.
- (16) Enaud L, Hadchouel A, Coulomb A, et al. *Pulmonary alveolar proteinosis in children on La Reunion Island: a new inherited disorder?* Orph J Rare Dis J 2014; 9: 85.
- (17) de Blic JDC. *Pneumol. Pédiatriq* 2018; 1: 505

L'ecografia polmonare per il pediatra

The lung ultrasound for the pediatrician

Giuseppe Gallo¹, Simone Fontijn², Elena Proietti¹, Giulia Cangiano³, Matteo Giuliani¹, Valeria Lucianer⁴, Francesca Sorrentino⁴, Grazia Dinnella¹, Lorenzo Iughetti⁵, Ugo Pradal¹

¹ U.O. di Pediatria, Centro di Supporto Provinciale per la Fibrosi Cistica, Ospedale Santa Maria del Carmine di Rovereto

² Scuola di Formazione specialistica in Pediatria, Università degli studi di Modena e Reggio Emilia

³ Pediatra specialista in Pneumologia Pediatrica

⁴ Scuola di Formazione specialistica in Pediatria, Università degli studi di Verona

⁵ Unità di Pediatria, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno-Infantili e dell'adulto, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico di Modena

Corrispondenza: Giuseppe Gallo, Simone Fontijn: email: giuseppe.gallo85@gmail.com s.fontijn88@gmail.com

Riassunto: L'ecografia polmonare si sta dimostrando una metodica di grande interesse e negli ultimi anni si è assistito ad un fiorire di pubblicazioni sull'argomento. In particolar modo, la sua semplicità d'uso e d'apprendimento ne stanno garantendo una forte diffusione. Se paragonata poi alla radiografia del torace, la più diffusa indagine di imaging in pneumologia pediatrica, l'ecografia polmonare appare molto promettente.

In questo articolo ci prefiggiamo di fornire alcune informazioni basilari sull'ecografia polmonare che possono però diventare un importante spunto per la comprensione di questa innovativa metodica.

Parole chiave: ecografia polmonare, imaging, diagnostica innovativa, polmonite, atelettasia.

Summary: The lung ultrasound is object of a strong interest and in the last years there has been a huge increase in the number of publications on the topic. Its simplicity of use and learning are ensuring it an increasingly widespread use. If compared to the chest radiograph, the most used imaging technique in pediatric pulmonology, lung ultrasound appears very promising.

In this article we aim to provide some basic information on lung ultrasound that can become an important start point for understanding this innovative technique.

Keywords: lung ultrasound, imaging, innovative diagnostics, pneumonia, atelectasis.

INTRODUZIONE

La diagnosi di molte patologie respiratorie può essere difficile in età pediatrica e le metodiche di *imaging* convenzionale [radiografia del torace e tomografia computerizzata (TC)] hanno sempre rappresentato gli strumenti più usati dal clinico per il completamento dell'*iter* diagnostico.

La radiografia del torace viene tutt'oggi considerata da molte linee guida un esame di primo livello in molti quadri clinici, nonostante richieda strumentazioni costose, esponga il paziente a radiazioni e non sia priva di variabilità operatore-dipendente.

Gli svantaggi di questa metodica e la crescente dimestichezza e conoscenza nei confronti dell'ecografia hanno quindi spinto i clinici a cercare nuove strade per la diagnostica polmonare.

L'ecografia polmonare (LUS, *Lung Ultra Sound*) è di facile esecuzione, si può eseguire al letto del paziente come nello studio di un pediatra di famiglia, non espone il paziente a radiazioni e può quindi essere ripetuta più volte senza effetti collaterali.

Questo articolo si prefigge di fornire concise informazioni sulla LUS focalizzando l'attenzione sugli aspetti di maggior interesse per il pediatra.

IMMAGINE ECOGRAFICA DI UN POLMONE NORMALE

L'aria è sempre stata considerata come il peggior nemico per l'ecografista, perché impedisce agli ultrasuoni di progredire e penetrare nei tessuti. Fino a qualche anno fa era quindi impensabile utilizzare l'ecografia come strumento per lo studio dei polmoni, perché si ottenevano

immagini “artefatte”, non interpretabili (1). Negli ultimi anni però questi “artefatti”, che sono di fatto immagini fasulle o distorte generate dalla macchina, hanno cominciato ad acquisire un significato clinico e la LUS ha iniziato ad avere un ruolo nella diagnostica respiratoria.

Se la sonda ecografica lineare viene posizionata longitudinalmente sul torace di un individuo sano, si crea un’immagine chiamata *bat-sign* (segno del pipistrello). Il *bat-sign* (figura 1) è rappresentato da una linea iperecogena (bianco intenso) costituita, da sinistra verso destra, dal margine della prima costa, dalla pleura polmonare (linea pleurica) e dal margine della seconda costa.

Poiché l’osso riflette gli ultrasuoni, dietro ogni costa, si crea un’area nera non visualizzabile, chiamata cono d’ombra. Fra i due coni d’ombra e sotto la linea pleurica si intravede il polmone. Essendo quest’ultimo pieno d’aria, si crea un “artefatto”, composto di tante linee orizzontali iper-ecogene, parallele alla linea pleurica. Queste linee vengono chiamate linee A (1).

L’ecografia inoltre, a differenza della radiologia polmonare convenzionale (TC e radiografia), ci dà un’immagine dinamica del polmone e non una semplice foto. Possiamo così vedere i due foglietti pleurici scorrere uno sull’altro. Questo movimento, detto *sliding* polmonare, si vede a livello della linea pleurica ed è sincrono con gli atti respiratori. Visualizzando invece le porzioni più basali del polmone si può vedere il diaframma in movimento.

Alterazioni del quadro ecografico descritto (*bat sign* con linee A + *sliding* polmonare + movimento del diaframma) sono segno di alterazioni polmonari patologiche.

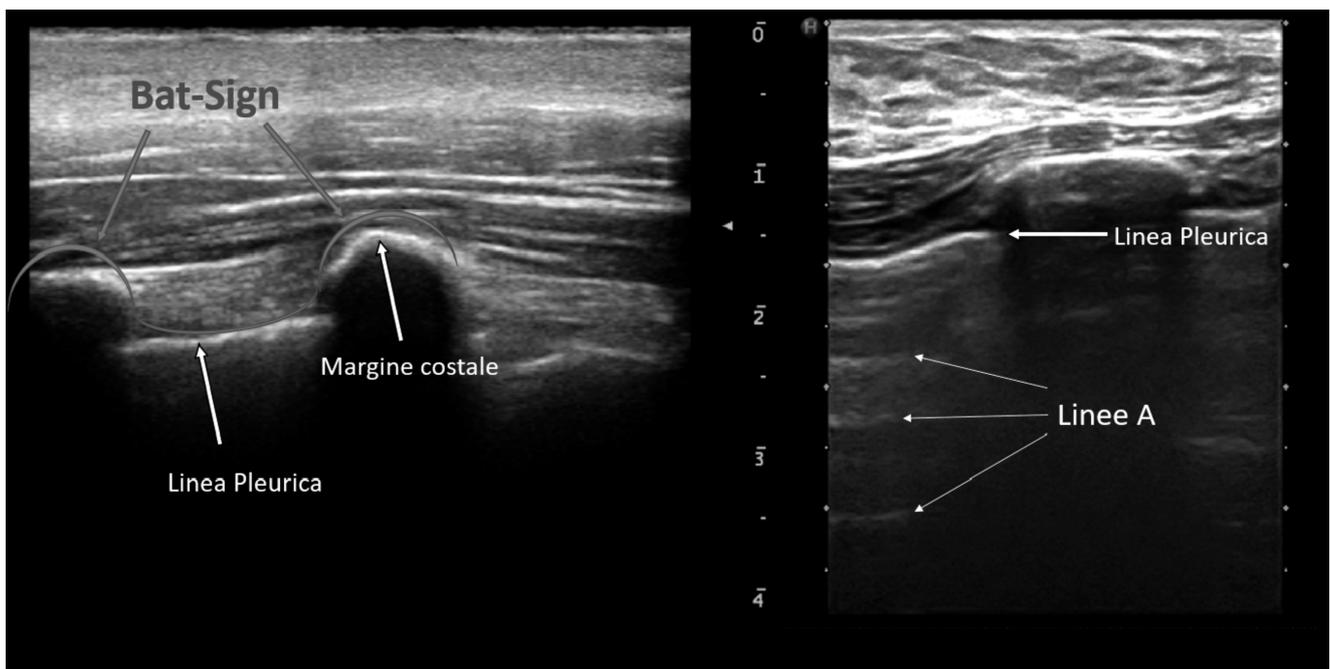


Fig 1. A sinistra in azzurro il segno del pipistrello (*bat-sign*), composto dal margine superiore delle due coste e dalla linea pleurica. A destra sono evidenti le linee A al di sotto della linea pleurica

ALTERAZIONI DELLO SLIDING POLMONARE

Si definisce *sliding* polmonare quel movimento di scorrimento della linea pleurica visibile attraverso la LUS. Come descritto sopra, il movimento corrisponde allo sfregamento dei due foglietti pleurici, è sincrono con gli atti respiratori e scompare fisiologicamente se si chiede al paziente di smettere di respirare per qualche secondo.

La sua assenza è segno di patologia ed è dovuta o a un’immobilità del polmone (aree di atelettasia/addensamento o errata intubazione) o all’interporsi di sostanze che determinano un distacco fra la pleura parietale e quella viscerale.

Tali sostanze sono più comunemente rappresentate da aria (come nello pneumotorace) o liquidi (come nel versamento pleurico).

Se si pone la sonda al centro di una vasta area di pneumotorace, non si vedrà alcun movimento della linea pleurica (nessuno *sliding* polmonare), ma l’aria che si interpone fra i due foglietti

pleurici continuerà a creare l'artefatto delle linee A.

Inoltre, poiché il polmone non tocca la parete del torace, non si creerà alcuna linea B. Se poi si sposta la sonda verso la periferia dell'area di pneumotorace, si individuerà un punto in cui improvvisamente comparirà lo *sliding* pleurico.

Questo punto della linea pleurica che si interpone fra un'area di assenza e una di presenza di *sliding* polmonare viene chiamato *lung point* e corrisponde al punto in cui il polmone ritorna a contatto con la parete toracica. L'altro segno ecografico che si riscontra nello pneumotorace è l'assenza di pulsazione polmonare (*lung-pulse*). Il *lung pulse* è un ritmico movimento della pleura sincrono con il ritmo cardiaco ed è il risultato della trasmissione dei battiti del cuore attraverso un parenchima polmonare poco areato. Nello pneumotorace, poiché il polmone non tocca la parete toracica, il *lung pulse* non viene trasmesso alla pleura parietale, che appare completamente immobile (1).

Più facile è valutare invece il versamento pleurico, che appare come una raccolta liquida ipo/anecogena sotto la linea pleurica. Oltre la falda di versamento è poi possibile riconoscere il parenchima polmonare. È possibile quantificare il versamento sia in termini qualitativi, descrivendone le caratteristiche (per esempio, il trasudato è anecogeno mentre l'essudato può essere ipoecogeno e/o corpuscolato), sia in termini quantitativi. È stato dimostrato infatti che l'ecografia mostra una migliore sensibilità e affidabilità rispetto alla radiografia del torace nel valutare estensione e caratteristiche del versamento pleurico (2).

LE LINEE B

Oltre alle già citate linee A, è possibile identificare alcune linee iperecogene che originano dalla linea pleurica e si propagano perpendicolarmente a questa e che vengono definite linee B (o code di cometa) (figura 2).

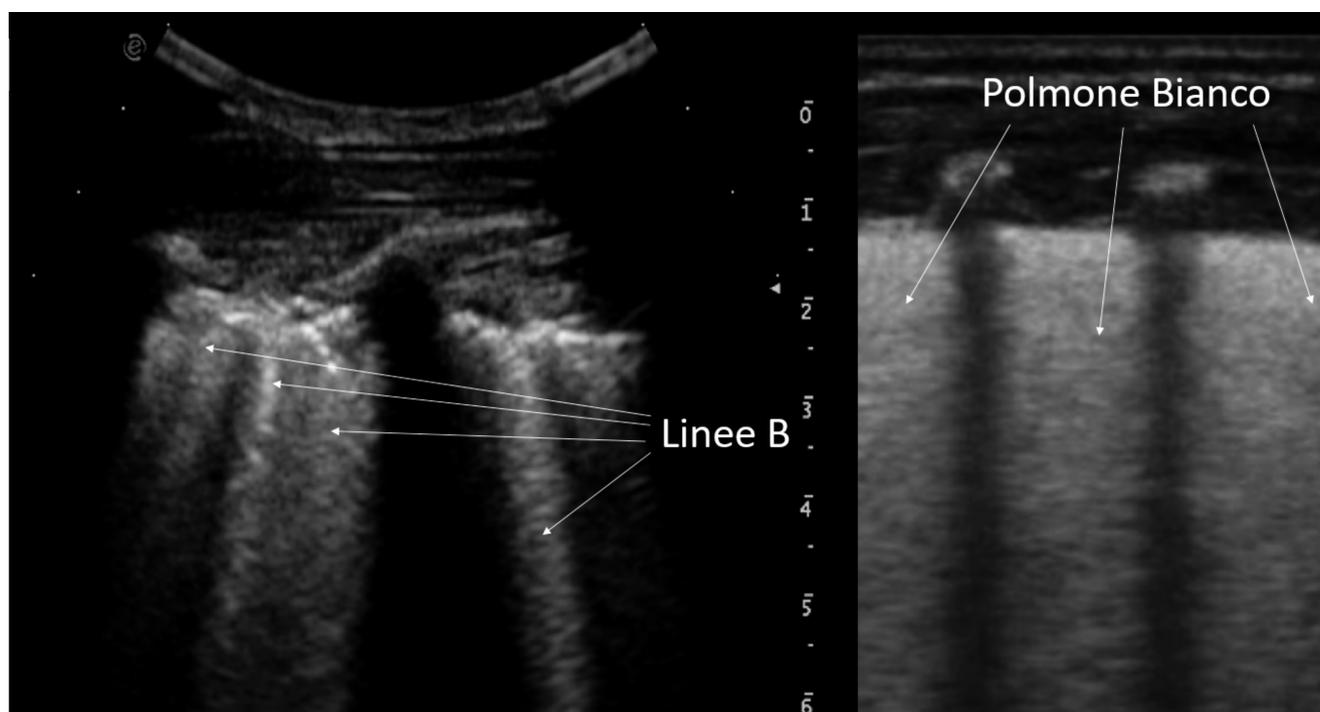


Fig. 2 A sinistra: a partenza dalla linea pleurica si vedono molte linee B, mentre non sono visualizzabili linee A. A destra: quadro di polmone bianco (*white lung*)

Le linee B sono artefatti che si formano per accumulo di liquido nei setti interlobulari. Normalmente queste linee sono assenti, ma vengono evidenziate in patologie che determinano un aumento di liquido a livello dell'interstizio polmonare, come l'interstiziopatia o l'edema polmonare (3). Maggiore è il numero di linee B, maggiore sarà il liquido presente a livello dei setti interlobulari e più "umi-

do” sarà il polmone (*wet lung*). Le linee B possono diventare così numerose da compattarsi in un quadro ecografico detto polmone bianco (*white-lung*), segno di forte imbibizione polmonare.

In ambito clinico, diversi studi hanno dimostrato come la presenza e le caratteristiche delle linee B siano indispensabili per distinguere fra dispnea di origine cardiogena e quella di origine respiratoria (4) e come siano utili, anche in situazioni di urgenza, nell’evitare l’iperidratazione, monitorando la quota di liquido extra-vascolare a livello polmonare (5).

In ambito pediatrico, le più frequenti patologie respiratorie caratterizzate da una forte predominanza di linee B sono: la sindrome da distress respiratorio (RDS, *respiratory distress syndrome*), la tachipnea transitoria del neonato (TTN) e l’inalazione di meconio. Queste patologie sono clinicamente difficili da distinguere fra loro, ma ecograficamente appaiono come quadri differenti. Nella TTN sono presenti molte linee B, che sono più rarefatte agli apici polmonari, ma divengono via via più numerose e compatte, fino a dare un polmone bianco, ai campi inferiori (6).

La linea pleurica appare sottile e ben definita e lo *sliding* è alterato in piccole aree, con conseguente formazione di quello che è chiamato *double-lung point*. La presenza di un *double-lung point* ha una specificità e una sensibilità del 100% nell’identificazione della TTN (7).

Nell’RDS si ha invece un quadro di *white lung* dagli apici fino alle basi del polmone, con una linea pleurica inspessita e irregolare. La somministrazione di surfattante, non determinando il riassorbimento del liquido dallo spazio interstiziale (8), non determina la risoluzione del quadro ecografico. Nell’inalazione di meconio, invece, il quadro appare spesso asimmetrico ed irregolare, con linee B diffuse, a tratti coalescenti ed a tratti sparse, frammiste a piccole aree di consolidamento subpleurico e incostanti aree di atelettasia polmonare (9).

ALTERAZIONI DEL PARENCHIMA POLMONARE

Un parenchima polmonare alterato si manifesta come un’area di consolidamento che è riconoscibile ecograficamente quando è in contiguità con la parete toracica. Se c’è soluzione di continuo fra area di addensamento e parete toracica, l’aria che si interpone fra di loro determina la formazione di un artefatto con linee A, ecograficamente indistinguibile da un polmone normale. Questo rappresenta uno dei principali limiti della LUS. In età pediatrica l’addensamento più frequente è la polmonite. Questa appare come un’area ipoecogena con margini irregolari, dietro ed attorno alla quale possono formarsi delle linee B (figura 3).

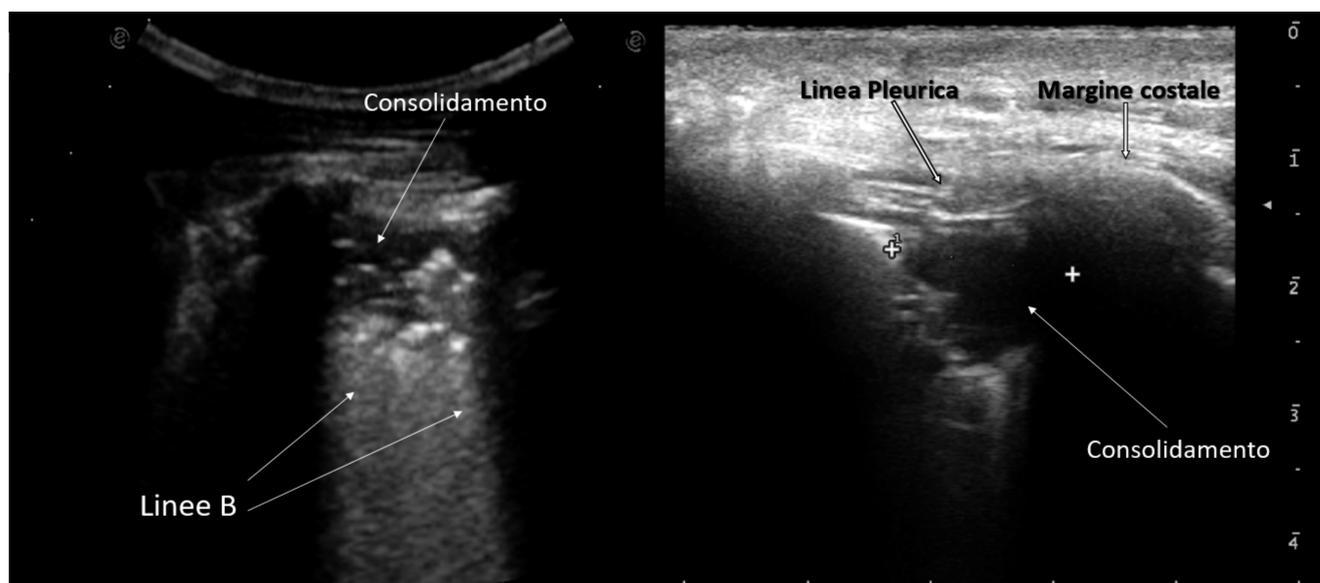


Fig. 3 Nell’immagine si vedono due addensamenti sub-plerici.

La linea pleurica appare più grossolana nell’area interessata dall’addensamento e lo *sliding*

polmonare risulta ridotto o assente.

In caso di polmoniti particolarmente estese, sono riconoscibili, all'interno del consolidamento, delle aree arboriformi, chiamate broncogrammi aerei, che anatomicamente corrispondono alle diramazioni bronchiali. La natura dinamica dell'ecografia permette inoltre di vedere l'aria muoversi all'interno di questi broncogrammi (broncogramma aereo dinamico), segno di pervietà bronchiale, che esclude l'atelettasia (10). Altro segno importante per escludere l'atelettasia è l'assenza del *lung-pulse* (11). L'addensamento atelettasico, di concerto con quanto detto sopra, si manifesta come un'area ipoecogena al cui interno è presente un broncogramma aereo statico (senza aria in movimento), lo *sliding* è assente ed è visualizzabile il *lung pulse* (11).

In letteratura diverse meta-analisi hanno evidenziato l'alta specificità (93-94%) e sensibilità (96-97%) della LUS nella diagnosi di polmonite acquisita in comunità (*community acquired pneumonia*, CAP) in età pediatrica (12-14). Balk e colleghi, in particolare, hanno evidenziato come la LUS abbia una sensibilità maggiore (95.5% *versus* 86.8%), a fronte di sovrapponibile specificità, rispetto alla radiografia del torace nella diagnosi di polmonite (15). Queste appaiono premesse interessanti per un possibile futuro utilizzo della LUS come esame di prima linea nella diagnosi di CAP al posto della radiografia del torace (16).

ALTERAZIONI DEL DIAFRAMMA

Spostandosi verso le basi del torace è possibile visualizzare il diaframma.

Esistono due metodiche per studiare questo muscolo: la valutazione delle escursioni della cupola diaframmatica in M-mode e la valutazione dello spessore del diaframma e del suo ispessimento durante l'ispirazione (17). Nel primo caso la sonda viene posizionata anteriormente sotto le coste e si usano a destra la finestra ecografica epatica (figura 4A) e a sinistra quella splenica per studiare rispettivamente l'emidiaframma destro e quello sinistro.

In età pediatrica si può scegliere di posizionare la sonda sotto il processo xifoideo e studiare simultaneamente, date le piccole dimensioni del torace di un bambino, entrambi gli emidiaframmi.

Nel secondo caso l'emidiaframma viene visualizzato fra due coste al di sotto dei muscoli intercostali e appare come uno strato ipoecogeno compreso fra due linee iperecogene (la linea pleurica e la linea peritoneale) (figura 4B). Lo spessore del diaframma dipende dal volume polmonare e normalmente aumenta con l'ispirazione. Ecograficamente il diaframma appare come una linea ecogena che si interpone fra il polmone ed il fegato o la milza. Tramite l'M-mode, una metodica di visualizzazione dei movimenti lungo una linea di scansione fissa, molto utile soprattutto per effettuare misurazioni, si può valutarne l'escursione (figura 4C).

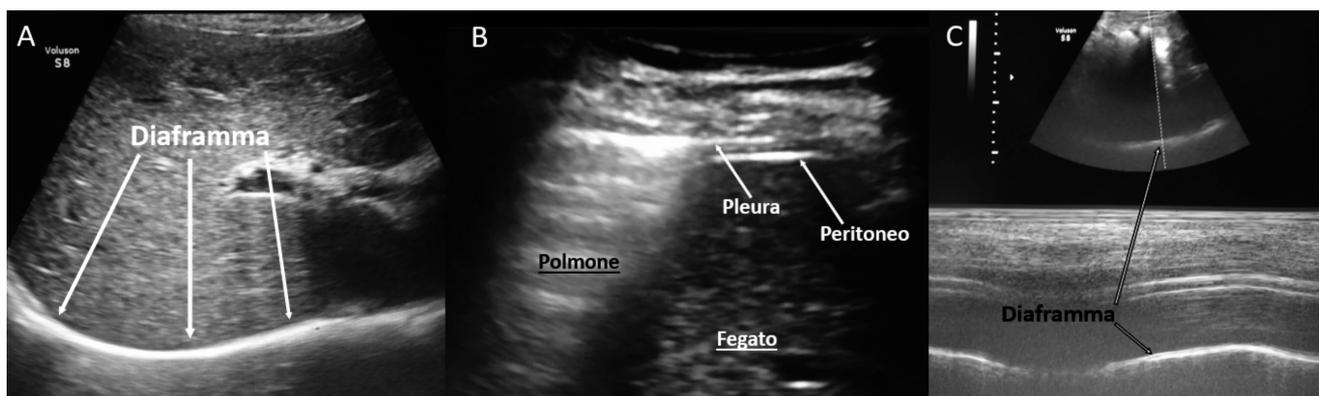


Fig. 4 A) Visualizzazione del diaframma attraverso la finestra epatica. B) A sinistra si vede il polmone con le linee A e a destra il fegato; compreso fra le linee della pleura e del peritoneo si evidenzia il diaframma. C) Visualizzazione del diaframma attraverso la finestra epatica in M-mode.

Alterazioni dell'escursione diaframmatica e riduzioni nello spessore e/o ispessimento in inspirazione del diaframma si evidenziano nella paralisi diaframmatica o in patologie croniche quali i

disordini neuromuscolari e la malattia polmonare ostruttiva cronica (17, 18).

Lo studio ecografico del diaframma viene anche impiegato in terapia intensiva per guidare lo svezzamento dalla ventilazione meccanica o l'eventuale rischio di reintubazione (19).

UNA METODICA ALLA PORTATA DI TUTTI

È stato dimostrato come la capacità di eseguire ecografie polmonari possa essere facilmente acquisita in breve tempo anche da studenti di medicina senza alcuna competenza in ambito ecografico (20, 21). Nello studio di Heiberg, 16 studenti senza alcuna competenza ecografica sono stati in grado di acquisire un buon livello di autonomia dopo un semplice corso *online* e 4 ore di *training* manuale (21). In ambito clinico, nel 2006 Bedetti ha dimostrato come personale inesperto, dotato di strumentazione tecnologicamente non all'avanguardia, fosse in grado di valutare, dopo soli 30 minuti di formazione, il significato clinico delle linee B tanto quanto un ecografista esperto dotato di un strumento più avanzato (22). La curva di apprendimento della LUS è molto rapida, tanto che in recenti studio si conclude che basta essere affiancati soltanto per 12-18 ecografie per acquisire un'ottima autonomia di esecuzione (23, 24).

CASO CLINICO

Matteo (nome di fantasia), bambino di 1 anno e 1 mese, veniva condotto in pronto soccorso pediatrico per febbre da alcuni giorni, vomito, diarrea ed inappetenza.

All'anamnesi patologica remota veniva segnalato esclusivamente un singolo episodio di bronchite asmatiforme a 11 mesi, trattato a domicilio.

All'esame obiettivo Matteo si presentava in buone condizioni generali, con un'obiettività generale sostanzialmente nella norma, fatta eccezione per una lieve desaturazione (SatO₂ 94%). Trattenuto in osservazione, si assisteva ad un progressivo peggioramento della dinamica respiratoria (con necessità di ossigenoterapia), associata a rumori umidi diffusi all'auscultazione toracica. Venivano eseguiti una radiografia del torace, con riscontro di polmonite apicale destra (figura 5A), ed esami ematici, che mostravano esclusivamente un aumento della proteina C reattiva (67 mg/L; valori normali < 2.9 mg/L). L'emogasanalisi venosa risultava nei limiti di norma.

Per la persistenza di ossigeno-dipendenza, Matteo veniva ricoverato presso il reparto di pediatria. In prima giornata di ricovero è stata iniziata terapia antibiotica con ceftriaxone (100 mg/kg/die) per via endovenosa. A seguito del progressivo peggioramento del *distress* respiratorio, in seconda giornata è stata effettuata ossigenoterapia ad alti flussi ed aggiunta terapia antibiotica con claritromicina (15 mg/kg/die) per via orale, salbutamolo spray con distanziatore e prednisone (1 mg/kg/die) per via orale. Al quinto giorno di ricovero persisteva invariata la necessità di supporto con alti flussi, per cui è stata intrapresa terapia aerosolica mucolitica con DNase (1250 UI per 2 volte al giorno) e soluzione ipertonica al 3%. Il giorno seguente è stata eseguita un'ecografia toracica con riscontro di area di epatizzazione a morfologia vagamente triangolare (di circa 3 x 4 cm) in sede apicale destra, con presenza di broncogramma aereo dinamico al suo interno ed in assenza di segni di versamento pleurico (figura 5B). Tale reperto rafforzava il sospetto di polmonite semplice e permetteva di escludere un quadro atelettasico. È stata anche eseguita una TC del torace, che mostrava fenomeni disventilatori a livello del segmento apicale e anteriore del lobo superiore destro, con broncogramma aereo contestuale, come da possibile impegno flogistico (figura 5 C), confermando quanto riscontrato all'ecografia. Esclusa la possibilità di un'atelettasia, si è deciso di modificare la terapia antibiotica, sostituendo i precedenti farmaci con tobramicina (6 mg/kg/die) e ceftazidime (75 mg/Kg/die), entrambi per via endovenosa.

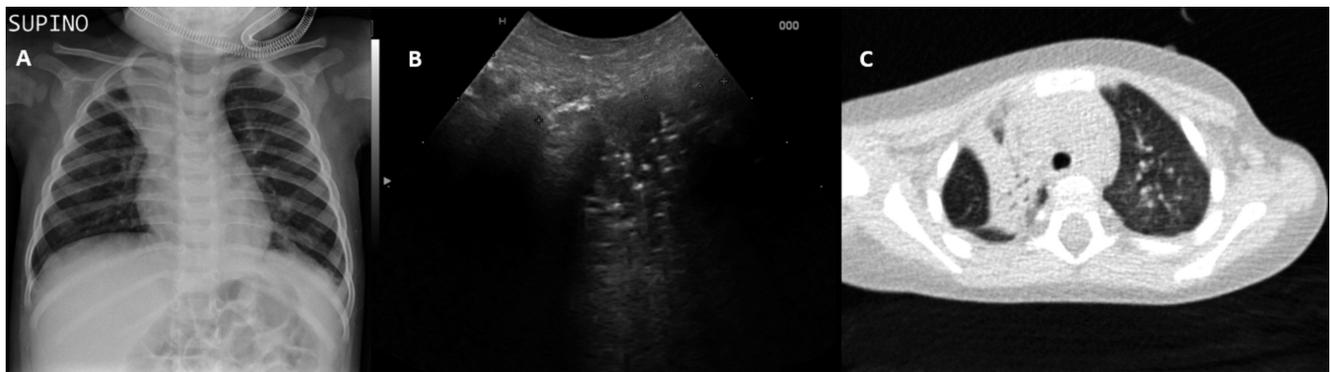


Fig. 5 A) Radiografia del torace: evidente opacità con broncogramma aereo a destra, in sede apicale para-mediastinica. Concomita inspessimento e risalita della piccola scissura interlobare omolaterale. B) Ecografia polmonare: area di epatizzazione a morfologia vagamente triangolare (di circa 3 x 4 cm) in sede apicale destra, con presenza di broncogramma aereo dinamico al suo interno ed in assenza di segni di versamento pleurico. C) TC del torace: fenomeni disventilatori a livello del segmento apicale e anteriore del lobo superiore destro, con broncogramma aereo contestuale, come da possibile impegno flogistico.

Dall'ottava giornata di ricovero, si è verificato un lento e graduale miglioramento della dinamica respiratoria, con progressiva riduzione dell'ossigenoterapia ad alti flussi fino alla sua completa sospensione in tredicesima giornata di ricovero.

Successivamente, Matteo si è sempre presentato eupnoico in aria ambiente.

Tutti gli esami infettivologici sono risultati negativi, ad eccezione del riscontro (alla biologia molecolare) di positività per Bocavirus, Rhinovirus ed Enterovirus.

L'assetto immunitario, il test del sudore e lo studio delle ciglia sono risultati nella norma.

DISCUSSIONE

La polmonite rappresenta la principale causa di morte nei bambini in tutto il mondo.

È stimata un'incidenza globale annua di circa 150-156 milioni di casi nei bambini al di sotto dei 5 anni di età, dei quali circa 11-20 milioni richiedono ospedalizzazione e 1.1 milioni vanno incontro ad *exitus* (25). Secondo le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e di altre società, la diagnosi di polmonite è clinica e la radiografia del torace è raccomandata solo nei casi severi e complicati (25-27). Uno dei limiti principali di questa metodica è però il rischio cancerogenico legato all'esposizione alle radiazioni ionizzanti, che è maggiore nei bambini in quanto più sensibili a tale esposizione (28). Abbiamo già descritto come la LUS rappresenti una tecnica di *imaging* utile nella valutazione di diverse patologie polmonari ed in particolare nell'individuazione della polmonite nei bambini. La sua sensibilità e specificità appaiono elevate e sovrapponibili, se non addirittura superiori, alla radiografia del torace (12-15).

Ciononostante nella metanalisi di Orso et al si sottolinea che, considerata l'elevata eterogeneità e l'assenza di uno *standard* di riferimento affidabile nei lavori analizzati, sono necessari ulteriori studi (14). La LUS inoltre è un esame sicuro, portatile, economico e relativamente semplice da insegnare. Per tutti questi motivi la LUS dovrebbe essere presa in considerazione come strumento di *imaging* di prima linea per la diagnosi di polmonite (16).

Il caso clinico proposto è un esempio di come non sempre sia semplice differenziare l'atelettasia da un semplice addensamento polmonare alla radiografia del torace.

L'esame ecografico invece, mediante il riscontro di un broncogramma aereo dinamico e l'assenza del *lung pulse*, permette di escludere la presenza di una atelelettasia ostruttiva, in cui per definizione non c'è passaggio di aria nei bronchi limitrofi all'addensamento (11).

Nel caso invece di un'atelelettasia da riassorbimento (per esempio, successiva ad una pregressa polmonite), si potrebbe riscontrare ecograficamente il broncogramma aereo, ma in tal caso si tratterebbe di un broncogramma non "dinamico", come nella polmonite, bensì "statico", in quanto l'aria è letteralmente intrappolata all'interno delle vie aeree (11).

Ciò rende la LUS uno strumento importante per quanto riguarda le decisioni terapeutiche, anche perché permette di monitorare nel tempo il paziente.

Se ecograficamente l'atelelettasia non si risolve, è indicato il ricorso ad una terapia inalatoria

con broncodilatatori, ed eventualmente mucolitici, ed alla fisioterapia respiratoria (29). Se anche ciò non induce miglioramento, può essere allora necessario eseguire una broncoscopia per indagare ed eventualmente rimuovere la causa dell'ostruzione (29).

CONCLUSIONI

Nel caso illustrato è stata utilizzata una metodica di *imaging* di recente applicazione nell'ambito della patologia polmonare pediatrica e dalle grandi prospettive future. La LUS è infatti una metodica di facile e rapido apprendimento per chiunque, fornisce numerose informazioni senza arrecare alcun danno al paziente ed ha un costo estremamente contenuto.

Questa metodica potrebbe in futuro non solo sostituire la convenzionale radiografia del torace come esame di prima linea in molti pronto soccorso, ma addirittura divenire uno strumento d'uso quotidiano anche per il pediatra di famiglia.

La tabella 1 presenta un quadro riassuntivo dell'aspetto delle linee pleuriche, del parenchima e del broncogramma alla LUS in base alla patologia.

Tab. 1: Rappresentazione riassuntiva delle linee pleuriche, della parenchima e del broncogramma in base alla patologia

PATOLOGIA	Linea Pleurica	Parenchima	Broncogramma	Note
Polmonite	- Irregolare e ipoecogena - Sliding ridotto o assente - Lung-pulse assente	- Area iper-ecogena	- Presente e dinamico	- Presenza di linee B attorno all'addensamento
Atelettasia	- Irregolare e ipoecogena - Sliding assente - Lung-pulse presente	- Area iper-ecogena	- Assente / Presente e statico	- Nell'atelettasia ostruttiva broncogramma aereo statico si vede nelle fasi iniziali. Scompare poi al progressivo riassorbirsi dell'aria
Embolia polmonare	- Ipoecogena - Sliding ridotto o assente	- Area ipo-ecogena	- Assente	- Lesione a margini netti spesso a forma triangolare - Possono essere presenti
Pneumotorace	- Sliding Assente - Lung-pulse assente	- Linee A - Totale assenza line B	-	- Presenza del Lung Point ai margini del PNX
Versamento Pleurico	- Sliding Assente - Lung-pulse assente	- Area anecogena / ipo-ecogena	-	- Può presentare caratteristiche diverse a seconda delle caratteristiche della raccolta liquida
Scompenso cardiaco/ eccesso fluidi	- Sliding presente	- Predominanza di linee B	-	- Più numerose verso le basi polmonari fino a quadri di white lung - Quadro simmetrico bilateralmente
TTN (tachipnea transitoria del neonato)	- Sliding presente	- Predominanza di linee B	-	- linee B più rarefatte agli apici e via via più compatte verso le basi polmonari - Quadro simmetrico bilateralmente - Presenza del double-lung point
RDS (sindrome da distress respiratorio)	- Inspessita ed irregolare - Sliding presente	- White lung diffuso	-	- Quadro simmetrico bilateralmente - nessun miglioramento ecografico dopo terapia con surfattante
Inalazione di meconio	- A tratti inspessita e irregolare - Sliding presente/ ridotto	- Predominanza di linee B - Aree iper-ecogene	Presente	- Le aree iperecogene corrispondono a piccole atelettasie o addensamenti - Quadro bilaterale ma asimmetrico ed irregolare

Bibliografia

- (1) Laursen CB, Davidsen JR, Gleeson F. *Thoracic Ultrasound*. ERS Monograph 2018; 2: 14-30.
- (2) Brogi E, Gargani L, Bignami E, et al. *Thoracic ultrasound for pleural effusion in the intensive care unit: a narrative review from diagnosis to treatment*. Crit Care 2017; 21: 325.
- (3) Summerfield DT, Johnson BD. *Hot topic in Ecocardiography, Lung Ultrasound Comet Tails – Technique and Clinical Significance*. Angelo Squeri Ed. 2013; 3: 51-64.
- (4) Cardinale L, Volpicelli G, Garofalo G, et al. *Clinical application of lung ultrasound in patients with acute dyspnea: differential diagnosis between cardiogenic and pulmonary causes*. Radiol Med 2009; 114: 1053-1064.
- (5) Lee CW, Kory PD, Arntfield RT. *Development of a fluid resuscitation protocol using inferior vena cava and lung ultrasound*. J Crit Care 2016; 31: 96-100.
- (6) Cattarossi L. *Lung ultrasound: its role in neonatology and pediatrics*. Early Human Development 2013; 89: S17-19.
- (7) Copetti R, Cattarossi L. *The “double lung point”: an ultrasound sign diagnostic of transient tachypnea of the newborn*. Neonatol 2007; 91: 203-209.
- (8) Cattarossi L, Copetti R, Poskurica B, et al. *Surfactant administration for neonatal respiratory distress does not improve lung interstitial fluid clearance: echographic and experimental evidence*. J Perinat Med 2010; 38: 557-563.
- (9) Liu J, Cao HY, Fu W. *Lung ultrasonography to diagnose meconium aspiration syndrome of the newborn*. J Int Med Res 2016; 44: 1534-1542.
- (10) Copetti R, Cattarossi L. *Ultrasound diagnosis of pneumonia in children*. Radiol Med 2008; 113): 190-198.
- (11) Lichtenstein DA, Lascols N, Prin S, et al. *The “lung pulse”: an early ultrasound sign of complete atelectasis*. Intensive Care Med 2003; 29: 2187-2192.
- (12) Hu Q-J, Shen Y-C, Jia L-Q, et al. *Diagnostic performance of lung ultrasound in the diagnosis of pneumonia: a bivariate meta-analysis*. Int J Clin Exp Med 2014; 7: 115-121.
- (13) Pereda MA, Chavez MA, Hooper-Miele CC, et al. *Lung ultrasound for the diagnosis of pneumonia in children: a meta-analysis*. Pediatrics 2015; 135: 714-722.
- (14) Orso D, Ban A, Guglielmo N. *Lung ultrasound in diagnosing pneumonia in childhood: a systematic review and meta-analysis*. J Ultrasound 2018; 21: 183-195.
- (15) Balk DS, Lee C, Schafer J, et al. *Lung ultrasound compared to chest X-ray for diagnosis of pediatric pneumonia: A meta-analysis*. Pediatr Pulmonol 2018 Apr 26. doi: 10.1002/ppul.24020.
- (16) Bourcier JE, Braga S, Garnier D. *Lung Ultrasound Will Soon Replace Chest Radiography in the Diagnosis of Acute Community-Acquired Pneumonia*. Curr Infect Dis Rep 2016; 18: 43.
- (17) Fayssoil A, Behin A, Ognà A, et al. *Diaphragm: Pathophysiology and Ultrasound Imaging in Neuromuscular Disorders*. J Neuromuscul Dis 2018; 5: 1-10.
- (18) Smargiassi A, Inchingolo R, Tagliaboschi L, et al. *Ultrasonographic assessment of the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease patients: relationships with pulmonary function and the influence of body composition - a pilot study*. Respiration 2014; 87: 364-371.
- (19) Li C, Li X, Han H, et al. *Diaphragmatic ultrasonography for predicting ventilator weaning: A meta-analysis*. Medicine (Baltimore) 2018; 97: e10968.
- (20) Lim JS, Lee S, Do HH, Oh KH. *Can Limited Education of Lung Ultrasound Be Conducted to Medical Students Properly? A Pilot Study*. Biomed Res Int 2017; 2017: 8147075.
- (21) Heiberg J, Hansen LS, Wemmelund K, et al. *Point-of-Care Clinical Ultrasound for Medical Students*. Int Open 2015; 1: E58-66.
- (22) Bedetti G, Gargani L, Corbisiero A, et al. *Evaluation of ultrasound lung comets by hand-held echocardiography*. Cardiovasc Ultrasound 2006; 4: 34.

- (23) See KC, Ong V, Wong SH, et al. *Lung ultrasound training: curriculum implementation and learning trajectory among respiratory therapists*. Intensive Care Med 2016; 42: 63-71.
- (24) Tutino L, Cianchi G, Barbani F, et al. *Time needed to achieve completeness and accuracy in bedside lung ultrasound reporting in intensive care unit*. Scand J Trauma Resusc Emerg Med 2010; 18: 44.
- (25) Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, et al. *WHO estimates of the causes of death in children*. Lancet 2005; 365: 1147-1152.
- (26) Bradley JS, Byington CL, Shah SS, et al. *The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: Clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis 2011; 53: e25.
- (27) Harris M, Clark J, Coote N, et al. *British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: Update 2011*. Thorax 2011; 66:S1-23.
- (28) Frush DP, Slovis TL. *Radiation bioeffects, risks, and radiation protection in medical imaging in children*. In: Coley BD, (ed). *Caffey's pediatric diagnostic imaging*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013;3-11.
- (29) Peroni DG, Boner AL. *Atelectasis: mechanisms, diagnosis and management*. Paed Respir Rev 2000; 1: 274-278.

INTERVENTISTICA IN PNEUMOLOGIA: DILATAZIONE TRACHEO-BRONCHIALE TRAMITE BALLOON E “CUTTING” BALLOON

Interventional Pulmonology: endoscopic balloon and “cutting” balloon dilatation

Antonella Frassanito¹, Antonino Francesco Capizzi²

¹Dipartimento di Pediatria, UOD Emergenza e Accettazione e Osservazione Breve Pediatrica, Policlinico Umberto I, Università “Sapienza” di Roma

²UOC Pneumologia ed Endoscopia respiratoria, IRCCS “G. Gaslini”, Genova

Corrispondenza: Antonella Frassanito **email:** antonella.frassanito@uniroma1.it, antonellafr@libero.it

Riassunto: La broncoscopia rappresenta una metodica efficace e sicura, sempre più diffusa in campo pediatrico, tanto che ha dato un enorme contributo alla pneumologia pediatrica, in ambito sia diagnostico sia terapeutico. Nella sua parte interventistica, permettendo di eseguire una biopsia della parete e delle masse endotracheo-bronchiali, effettuare trattamenti *laser*, posizionare *stent* e dilatare le vie aeree mediante palloncino, può evitare l'esecuzione di procedure chirurgiche ben più invasive. In particolare, la dilatazione endoscopica tracheo-bronchiale tramite *balloon* o “cutting” *balloon* nella popolazione pediatrica permette di ottenere un miglioramento della sintomatologia respiratoria nei bambini affetti da stenosi dell'albero tracheo-bronchiale, grazie ad una “normalizzazione” del diametro delle vie aeree. Talora, come nel caso clinico di seguito presentato, è necessario che la procedura interventistica sia ripetuta, anche più volte, prima di ottenere un risultato efficace e duraturo. Al fine di ridurre al minimo il rischio di insuccesso, è vantaggioso che il Centro esecutore abbia una buona esperienza pratica e sia circondato da un *team* multidisciplinare, composto di esperti che prendano in carico, nelle sue differenti problematiche, il bambino, assistendolo in maniera adeguata lungo il suo *iter* diagnostico-terapeutico.

Parole chiave: Broncoscopia flessibile, dilatazione tracheo-bronchiale con *balloon* e *cutting balloon*, stenosi tracheo-bronchiale

Summary: Bronchoscopy is an effective and safe method, increasingly widespread in the pediatric field, that gave a great contribution to the Paediatric Pneumology, both in the diagnostic and in the therapeutic fields. Bronchoscopy is used to perform biopsy of the lung and endotracheo-bronchial masses, to perform laser treatments, to place stents and to dilate the airways by means of a balloon, thus avoiding the execution of much more invasive surgical procedures. In particular, tracheo-bronchial endoscopic dilatation by balloon or “cutting” balloon in the paediatric population allowed to obtain an improvement in respiratory symptoms in children with tracheobronchial tree stenosis, thanks to a “normalization” of the airway caliber. Sometimes, as in the clinical case presented below, it is necessary to repeat the procedure, even several times, before obtaining an effective and lasting result. In order to minimize the risk of failure, it is useful that the performing Center has a good practical experience and has a multidisciplinary airway team, composed of experts who are able to cure the child during his diagnostic-therapeutic pathway.

Key words: Flexible bronchoscopy, balloon dilation, cutting balloon, tracheo-bronchial stenosis

L'endoscopia pediatrica delle vie aeree è ormai diventata una procedura essenziale nella diagnosi e nel trattamento di molte patologie delle vie aeree e del polmone in età pediatrica, impiegando strumenti sia rigidi sia flessibili (1, 2). La broncoscopia rigida è stata la prima metodica utilizzata per visualizzare l'anatomia delle vie aeree, mentre risale al 1978 la prima pubblicazione sull'utilizzo della broncoscopia flessibile in età pediatrica (3). In seguito, l'utilizzo della procedura endoscopica sulle vie aeree del bambino si è gradualmente diffuso e attualmente numerose sono le sue indicazioni, tanto che recentemente sia l'*American Thoracic Society* (ATS) sia l'*European Respiratory Society* (ERS) hanno istituito una *task force* ed hanno poi pubblicato le indicazioni all'utilizzo della broncoscopia flessibile in età pediatrica (2, 4).

La broncoscopia flessibile è attualmente impiegata con intenti sia diagnostici sia interventistici per visualizzare l'anatomia del laringe e delle basse vie aeree, eseguire il lavaggio bronco-alveolare (BAL) e le biopsie bronchiali, rimuovere i corpi estranei, dilatare le vie aeree con l'impiego di *balloon*, posizionare *stent* tracheali o bronchiali ed eseguire il trattamento laser di lesioni endoluminali come la papillomatosi tracheobronchiale (5). Attualmente si tende a ricorrere all'u-

tilizzo del broncoscopio rigido soprattutto per la rimozione dei corpi estranei (6, 7, 8) (tabella 1), mentre la maggior parte delle patologie respiratorie che si manifestano con sintomi persistenti o ricorrenti rappresentano possibili indicazioni all'esecuzione di una broncoscopia flessibile.

Tab. 1: Indicazioni alla broncoscopia	
INDICAZIONI ALLA BRONCOSCOPIA	
-	Sospetta inalazione di corpo estraneo
-	Stridore (in e/o espiratorio)
-	Wheezing ricorrente/persistente
-	Tosse cronica persistente
-	Bronchiectasie
-	Broncopolmoniti ricorrenti
-	Adenopatie mediastiniche
-	Pneumopatie interstiziali
-	Emottisi

La procedura in età pediatrica è sempre eseguita in anestesia generale e locale, iniettando lidocaina a livello del laringe e della carena tracheale per diminuire la reattività delle vie aeree. L'endoscopia viene generalmente ben tollerata dalla maggior parte dei pazienti, che non presentano comunemente complicanze di rilievo (5, 9), di cui le più comuni sono l'ipossiemia con ipercapnia ed il laringo/broncospasmo. Più raramente si possono presentare aritmia e bradicardia, epistassi/emottisi, edema subglottico o comparsa di febbre post-procedurale (soprattutto dopo una procedura BAL). Lo pneumo-mediastino può complicare essenzialmente le broncoscopie eseguite con strumentazione rigida o le procedure di dilatazione delle vie aeree. Prima o durante la broncoscopia è possibile attuare numerosi accorgimenti che permettono di ridurre l'incidenza delle complicanze intra/post-procedurali. Oltre chiaramente ad evitare di sottoporre ad endoscopia respiratoria i pazienti con elevato rischio procedurale, si può somministrare, soprattutto prima della procedura, terapia topica broncodilatatrice ai bambini affetti da iperreattività bronchiale ed O₂-terapia in caso di desaturazione.

Tra le tecniche endoscopiche terapeutiche/operative più invasive utilizzate in età pediatrica si annoverano il posizionamento di *stent*, il trattamento *laser* di lesioni endo-luminali e la dilatazione delle vie aeree mediante *balloon* o "cutting" *balloon* (2). Per quest'ultima metodica non ci sono *balloon* specifici per le vie aeree, ma si impiegano i devices usati dai cardiologi per eseguire dilatazioni endo-luminali dei vasi arteriosi.

La prima descrizione della dilatazione con *balloon* tramite broncoscopia in caso di stenosi tracheobronchiale risale al 1984 (10, 11); da allora la tecnica viene utilizzata ampiamente nel trattamento delle stenosi laringo-tracheo-bronchiali. La metodica è eseguita con un broncoscopio flessibile e come primo atto si esegue la tracheo-broncografia, iniettando mezzo di contrasto idrosolubile attraverso il canale operativo dello strumento. Si ottiene così una buona visualizzazione delle vie aeree centrali, con possibilità di misurare il diametro della stenosi e quindi di paragonarlo al lume delle vie aeree non stenotiche. Sulla base di queste misurazioni si potrà quindi scegliere il calibro del *balloon* da impiegare, che dovrebbe essere uguale o di poco superiore a quello delle vie aeree non stenotiche poste in prossimità del tratto stenotico. Il *balloon* dovrebbe, inoltre, essere un po' più lungo del tratto stenotico. Il suo posizionamento nella sede opportuna è eseguito facendolo procedere lungo un filo guida, introdotto nelle vie aeree attraverso il canale operativo del broncoscopio, che poi viene rimosso lasciando in sede il filo guida. Il *balloon*, fatto avanzare sotto controllo radiologico fino alla zona stenotica, viene quindi dilatato con mezzo di contrasto diluito 1:1 con soluzione salina. La distensione del pallone, possibilmente fino al suo diametro nominale, può essere eseguita sia manualmente, sia impiegando un "insufflatore" o pompa manuale a vite che, collegata ad un manometro, può monitorare la pressione all'interno del palloncino.

Tale pressione può essere spinta fino a raggiungere le atmosfere di insufflazione indicate sulla confezione del *balloon*. Non c'è chiara raccomandazione sul tempo ottimale per l'inflazione del *balloon*. Secondo alcuni autori il palloncino si dovrebbe mantenere disteso per almeno 30-60 secondi e, in ogni caso, la procedura dovrebbe essere interrotta nel caso di un peggioramento dei segni vitali (12). La distensione del *balloon* viene ripetuta generalmente diverse volte, con lo stesso *balloon* o talvolta con uno di diametro maggiore. In caso di grave stenosi, con pareti delle vie aeree particolarmente fibrotiche e poco distendibili, si può decidere di utilizzare un "cutting" *balloon*. Questa procedura è più invasiva della dilatazione mediante *balloon* "semplice" perché il palloncino, rivestito esternamente da piccole lamine, dilatandosi seziona longitudinalmente le pareti fibrotiche della stenosi tracheo-bronchiale.

La dilatazione con *balloon*, generalmente, si impiega per dilatare le stenosi tracheo-bronchiali congenite o acquisite, ma i *balloon* si possono impiegare anche nel trattamento delle emottisi massive e delle fistole broncopleuriche. In questi casi chiaramente il palloncino non viene gonfiato solo momentaneamente, ma viene lasciato dilatato nella via aerea periferica per il tempo necessario. Potenziali complicanze di questa procedura possono essere la rottura della parete tracheo-bronchiale nella sede trattata dalla dilatazione e l'infezione della parete della via aerea, soprattutto se la metodica è eseguita su paziente infetto (13).

La procedura di dilatazione tracheo-bronchiale tramite *balloon* o *cutting balloon*, pur essendo limitata a pochi centri pediatrici altamente specializzati, si sta gradualmente diffondendo. Per ottenere una buona dilatazione delle vie aeree con conseguente miglioramento della sintomatologia respiratoria, è però spesso necessario che la procedura interventistica sia ripetuta anche diverse volte, al fine di ottenere una dilatazione soddisfacente e capace di mantenersi tale nel tempo.

CASO CLINICO

Descriviamo il caso di un bambino di quattro anni affetto da stenosi tracheale congenita a segmento lungo (*Congenital Long Segment Tracheal Stenosis, CLSTS*) associata a *sling* dell'arteria polmonare, seguito fin dalla nascita dal team multidisciplinare delle vie aeree (*Tracheal Team*) dell'Istituto G. Gaslini di Genova. Il paziente era affetto da sindrome da pre-eccitazione ventricolare di Wolff-Parkinson-White, persistenza della vena cava superiore sinistra e difetti interventricolari multipli. Già alla nascita il bambino presentava stridore e grave *distress* respiratorio, con necessità di intubazione endotracheale e ricovero in unità di terapia intensiva neonatale (UTIN).

La tracheografia dimostrava come il tratto stenotico presentasse un lume di soli 2 mm. All'età di due mesi (novembre 2014) veniva effettuato in ECMO (*Extra Corporeal Membrane Oxygenation*) un intervento di tracheoplastica (*slide tracheoplasty*) e risoluzione dello *sling*, con reimpianto dell'arteria polmonare nella sua normale sede anatomica. A fine intervento, sotto controllo endoscopico, si posizionava senza difficoltà, a circa 1 cm dalla carena, un tubo endotracheale di diametro interno pari a 3.5 mm (diametro esterno, 4.8 mm). Il controllo contrastografico post-operatorio confermava la buona riuscita della tracheoplastica.

Il bambino veniva quindi inserito in un programma di *follow-up* clinico e strumentale, presso il centro di pneumologia del nostro Istituto. Nel corso dell'inverno 2015, mentre il paziente era ancora ricoverato in UTIN, si erano rese necessarie frequenti manovre di intubazione endotracheale. A marzo 2015, per la persistenza di stenosi tracheale sovra-carenale, veniva posizionato a tale livello uno *stent* endotracheale di tipo riassorbibile. Seguivano, con cadenza di 2-3 settimane, fibro-broncoscopie di controllo, durante le quali la zona stenotica con *stent* veniva trattata con ripetute dilatazioni endoscopiche mediante *balloon* di 8 mm di diametro esterno e 3 cm di lunghezza; le tracheografie dopo le dilatazioni evidenziavano un diametro tracheale superiore a 5 mm anche nella zona della pregressa stenosi. A Maggio 2015, ha effettuato TC del torace con ricostruzione 3D (figura 1).

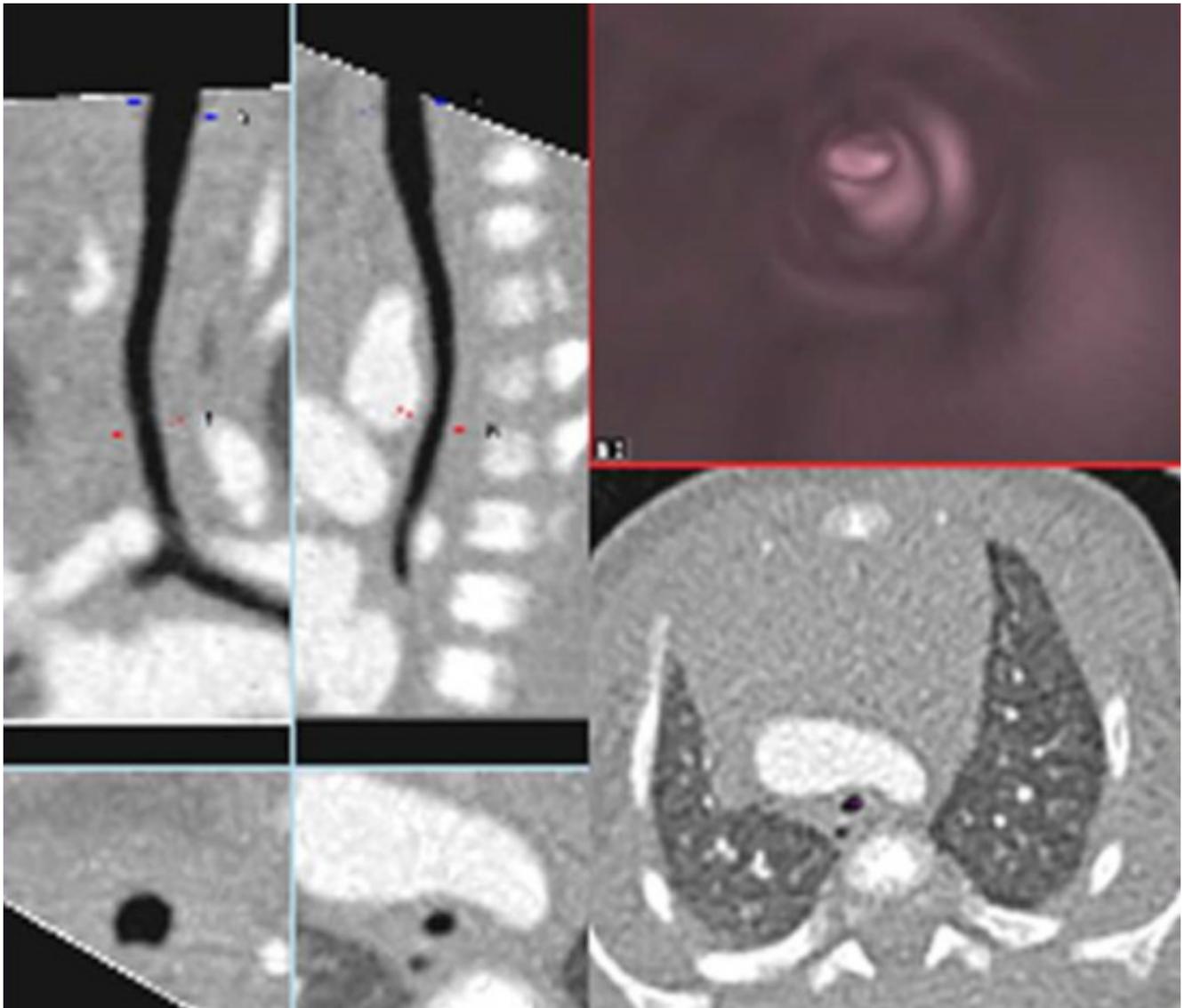


Fig. 1 Immagini tratte da TC torace con ricostruzione 3D (maggio 2015). Trachea lievemente scoliotica e ridotta di calibro dall'altezza dei tronchi sovraaortici fino alla carena, improntata anteriormente dal tronco arterioso brachio-cefalico e soprattutto dall'arco dell'aorta e più in basso circondata dalla biforcazione polmonare e dall'arteria polmonare sinistra

La tracheoscopia con grafia dimostrava la dissoluzione dello *stent* e la ricomparsa della stenosi tracheale, con lume di appena 2.47 mm nel punto più ristretto. Si effettuava, pertanto, una dilatazione endoscopica tramite *balloon* da 10 mm x 4 cm, ma senza riuscire a distendere in maniera significativa la stenosi, che appariva di natura fibrotica.

Si impiegava quindi un *cutting balloon* da 7 mm x 2 cm che, portato alla sua pressione di esercizio di 10 atmosfere, mostrava dopo diverse dilatazioni una progressiva anche se parziale risoluzione della stenosi, così che le pareti del *balloon* presentavano una quasi completa rettilinearizzazione.

L'esame contrastografico effettuato subito dopo la procedura mostrava, a livello della stenosi, un diametro tracheale di 3.4 mm.

Nei mesi successivi, le condizioni cliniche del bambino si mantenevano soddisfacenti (respiro solo lievemente rumoroso); altre due procedure endoscopiche erano eseguite con dilatazioni della zona sovracarenale, impiegando palloni *non cutting*, con valori contrastografici che dimostravano come la stenosi tracheale fosse nel punto più ristretto di circa 4 mm.

Con l'avvento della stagione invernale 2015-2016, il piccolo paziente ha iniziato a presentare episodi di broncopolmonite, che richiedevano l'ospedalizzazione e cicli di antibiotico terapia parenterale. A Febbraio 2016 insorgevano gradualmente, anche in benessere, dispnea e respiro rumoroso. La tracheografia dimostrava ricomparsa di stenosi, che nel punto più ristretto

presentava un diametro inferiore a 3 mm. Veniva pertanto ripetuta la dilatazione tracheale mediante *cutting balloon* da 8 mm x 2 cm. Con diverse procedure di dilatazione fino a 10 atmosfere si riusciva a dilatare il *cutting balloon* fino ad un diametro di 7.5 mm anche a livello del punto più ristretto della stenosi (figura 2).



Fig. 2 Immagini tratte da fibro-tracheo-broncoscopia (febbraio 2016). Si visualizza il tratto della stenosi tracheale prima dell'avvio dei cicli di dilatazione mediante "cutting" balloon. Da notare che, in corso di procedura endoscopica, non era possibile attraversare il tratto stenotico con il fibrobroncoscopio di diametro esterno 3.8 mm

Nei mesi seguenti il bambino presentava numerose flogosi febbrili delle vie aeree e respiro con lieve timbro rumoroso. A giugno 2017 al controllo endoscopico e contrastografico il tratto tracheale stenotico era di 5.26 mm di diametro, mentre il diametro di trachea normo-conformata era circa 11.5 mm. Si procedeva quindi ad una terza dilatazione mediante *cutting balloon* da 8 mm x 2 cm, ma non veniva eseguito in questo caso controllo contrastografico dopo la procedura.

Da allora il paziente è stato seguito in *follow-up* presso il centro di pneumologia dell'Istituto ogni 6 mesi circa (figura 3).

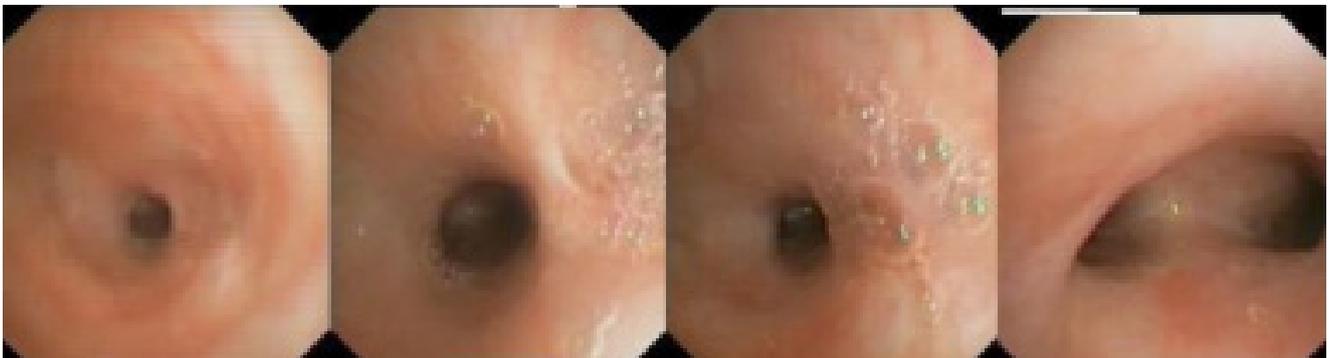


Fig. 3: Immagini tratte da fibrotracheo-broncoscopia (gennaio 2018): ultimo controllo fibrobroncoscopico. Permane il tratto stenotico a livello tracheale sovracarenale, anche se viene agevolmente superato dal fibrobroncoscopio di diametro 3.8 mm. Sparse secrezioni, non puruloidi, per evento infettivo acuto intercorrente

Il bambino ha presentato un sensibile miglioramento delle condizioni cliniche, con respiro a timbro dolce e riduzione del numero di infezioni respiratorie ricorrenti.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Midulla F, de Blic J, Barbato A. *Flexible endoscopy of paediatric airways. ERS Task Force.* Eur Respir J 2003; 22: 698-708.
- (2) Eber E, Antón-Pacheco JL, de Blic J. *ERS statement: interventional bronchoscopy in children.* Eur Respir J 2017; 14: 50.
- (3) Wood RE, Fink RJ. *Applications of flexible fiberoptic bronchoscopes in infants and children.* Chest 1978; 73: 737-740.
- (4) Faro A, Wood RE, Schechter MS, et al. *Official American Thoracic Society technical standards: flexible airway endoscopy in children.* Am J Respir Crit Care Med 2015; 191: 1066-1080.
- (5) Eber E, Midulla F. *ERS Handbook. First Edition.* 2013, 115-120.
- (6) Schellhase DE. *Pediatric flexible airway endoscopy.* Curr Opin Pediatr 2002; 14: 327-333.
- (7) Nicolai T. *Pediatric bronchoscopy.* Pediatr Pulmonol 2001; 31: 150-164.
- (8) Martinot A, Closset M, Marquette CH, et al. *Indications for flexible versus rigid bronchoscopy in children with suspected foreign-body aspiration.* Am J Respir Crit Care Med 1997; 145: 1676-1679.
- (9) De Blic J, Marchac V, Scheinmann P. *Complications of flexible bronchoscopy in children: prospective study of 1,328 procedures.* Eur Respir J 2002; 20: 1271-1276.
- (10) Cohen MD, Weber TR, Rao CC. *Balloon dilatation of tracheal and bronchial stenosis.* AJR Am J Roentgenol 1984; 142: 477-478.
- (11) Chueng K, Chadra NK. *Primary dilatation as a treatment for pediatric laryngotracheal stenosis: a systematic review.* Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2013; 77: 623-628.
- (12) Ortiz R, Dominguez E, De La Torre C, et al. *Early endoscopic dilatation and mitomycin application in the treatment of acquired tracheal stenosis.* Eur J Pediatr Surg 2014; 24: 39-45.
- (13) Hathorn C, Armitage N, Wensley D, et al. *Bronchial balloon occlusion in children with complex pulmonary air leaks.* Arch Dis Child 2013; 98: 136-140.

Allergologia molecolare

Component Resolved Diagnosis

Carla Mastrorilli,^{1,2} Paola Di Filippo³

¹ UOC Pediatria e Neonatologia, Ospedale “Madonna delle Grazie”, Matera

² Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Parma, Parma

³ Clinica Pediatrica, Ospedale “SS. Annunziata”, Chieti

Corrispondenza: Carla Mastrorilli **email:** carla.mastrorilli@icloud.com; Paola Di Filippo email: difilippopaola@libero.it

Riassunto: Si definisce allergene ogni molecola che si lega ad anticorpi IgE. Le fonti allergeniche contengono vari allergeni, di cui uno o più dominanti (maggiori), e che si classificano in marcatori di sensibilizzazione genuina e di cross-reattività. Saranno presentate nel seguente articolo le caratteristiche degli allergeni, la loro nomenclatura internazionale e la loro rilevanza clinica. L'allergologia molecolare permette all'allergologo di ottimizzare l'approccio diagnostico, offrendo una maggiore precisione, con il fine ultimo di una migliore efficacia dell'immunoterapia allergene-specifica. Inoltre, rende possibile identificare la fonte allergenica e l'allergene responsabile della sintomatologia, predire la severità delle reazioni e la loro storia naturale, prevenire sintomi di cross-reattività inattesi ed evitare restrizioni dietetiche inutili in caso di allergia alimentare.

Parole chiave: allergene, diagnostica molecolare, ISAC

Summary: Allergens are defined as molecules that binds to IgE. Allergenic sources contain one or more dominant allergens, that can be classified as genuine sensitization markers or cross-reactivity markers. Characteristics of allergens, their international nomenclature and their clinical relevance will be presented in the following article. Component resolved diagnostics (CRD) allows the allergologist to optimize the diagnostic approach to allergic diseases, thus offering a higher precision, with the ultimate goal of improving the efficacy of allergen-specific immunotherapy. Moreover, CRD allows to identify the allergenic source and the molecular allergen responsible for symptoms, to predict the severity of reactions and their natural history, to prevent unexpected cross-reactivity, and to avoid unnecessary dietary restrictions for food allergy.

Key words: allergen, component resolved diagnostics, ISAC

INTRODUZIONE

I test allergologici *in vitro* rappresentano un rilevante strumento diagnostico e di monitoraggio nelle patologie allergiche (1). Il primo test per il dosaggio delle IgE totali (PRIST) e specifiche (RAST) fu introdotto nel 1972, utilizzando metodiche RIA basate sugli estratti allergenici ottenuti dalla fonte originaria attraverso processi di estrazione proteica e purificazione (2).

Negli anni sono stati compiuti importanti progressi e si è assistito al passaggio a metodiche ELISA (3) (figura 1).

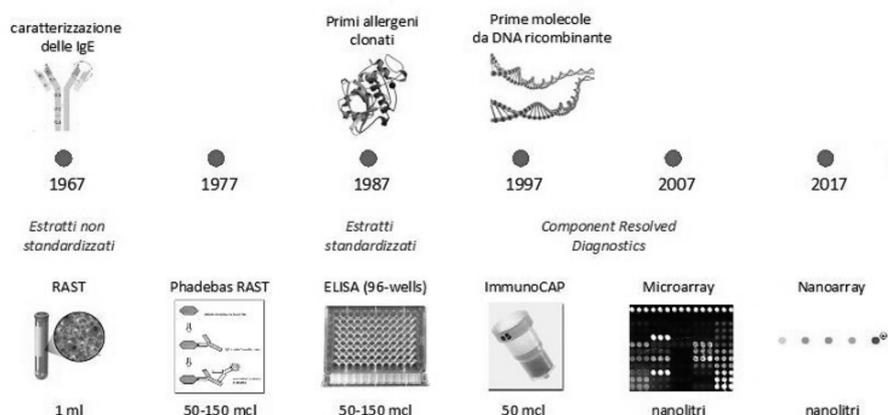


Fig. 1 Timeline della ricerca allergologica

L'avvento delle nanotecnologie e della biologia molecolare ha portato a identificare, sequenziare, caratterizzare e clonare un gran numero di molecole allergeniche e di loro iso-forme (4). Un buon numero di tali proteine allergeniche è attualmente disponibile per la diagnostica allergologica *in vitro* (la cosiddetta *Component Resolved Diagnostics* o CRD) (5).

Un'ulteriore rivoluzione nella diagnostica allergologica è stata rappresentata dall'utilizzo di nanotecnologie mediante *micro-array* (6). Tuttavia, la presenza di anticorpi IgE nel siero del paziente (così come la cuti-positività) non consente di formulare con certezza una diagnosi allergologica se estrapolata dal contesto clinico (7). Un'elevata concentrazione di IgE specifiche non indica sempre la presenza di patologie clinicamente gravi e viceversa, così com'è importante sottolineare che la storia naturale della patologia allergica è influenzata da molti altri fattori (ad esempio, l'esposizione all'allergene).

CHE COS'È UN ALLERGENE?

Si definisce allergene ogni molecola che si lega ad anticorpi IgE (8).

Spesso si tratta di proteine, meno frequentemente di composti non proteici (ad esempio, penicillina o glicani). La maggior parte, ma non tutti gli allergeni, sono sensibilizzanti (inducono cioè la produzione di anticorpi IgE allergene-specifici). Il processo di sensibilizzazione può avvenire:

- attraverso la mucosa delle vie aeree tramite inalazione;
- nel tratto digerente, dove l'allergene viene introdotto come componente di un alimento o di una bevanda;
- per via percutanea (soprattutto se la cute è lesa).

Per attraversare i tessuti, la proteina allergenica deve essere in soluzione oppure ancorata ad una particella (per gli allergeni inalatori), quale una spora di muffa, un grano di polvere, una particella fecale dell'acaro, ecc. È così attivata la fase di sensibilizzazione, che consiste nell'interazione con una cellula presentante l'antigene e, al secondo contatto con l'allergene, si scatena la reazione allergica, mediata dal legame degli anticorpi IgE sulla superficie delle mastcellule o basofili.

Anche gli allergeni non-sensibilizzanti possono scatenare reazioni allergiche, nel caso in cui un precedente contatto con un allergene cross-reattivo abbia causato la sensibilizzazione (ad esempio, Bet v1 della betulla e l'omologo cross-reattivo non sensibilizzante Mal d1 della mela) (9).

QUAL È LA NOMENCLATURA DEGLI ALLERGENI?

Gli allergeni sono denominati in base al nome scientifico della specie delle piante o degli animali da cui originano (10). Ad esempio, Bet v1, allergene maggiore del polline della betulla (*Betula verrucosa*), è designato con le prime tre lettere del genere (Bet) e la prima lettera della specie (v). La base del nome è poi seguita da un numero, assegnato in ordine di scoperta. Bet v1 è quindi il primo allergene scoperto derivante da polline di betulla. Molti allergeni hanno diverse iso-forme, come Cor a1, la cui variante molecolare Cor a1.01 si trova nel polline del nocciolo e Cor a1.04 nella nocciola. Alcune iso-forme presentano un'alta omologia di sequenza e sono considerate usualmente identiche, per cui vengono distinte aggiungendo altri due numeri al nome (ad esempio, Cor a1.0101 e Cor a1.010102).

LA RILEVANZA CLINICA DEGLI ALLERGENI

Allergie respiratorie

Le fonti allergeniche inalanti contengono uno o più allergeni maggiori, che bisogna distinguere tra marcatori di sensibilizzazione primaria e di cross-reattività (11). Questa discriminazione è importante soprattutto nei paesi mediterranei, caratterizzati da frequenti poli-sensibilizzazioni, elevata concentrazione pollinica e stagioni polliniche sovrapposte.

Tra gli inalanti stagionali esistono fenomeni di cross-reattività tra proteine omologhe presenti nell'ambito di singole specie polliniche (ad esempio, *Phleum pratense* e famiglia delle graminacee), proteine omologhe in un numero limitato di specie polliniche distinte (ad esempio, allergeni del gruppo 11 delle graminacee e allergene maggiore del polline dell'olivo) o proteine filogeneticamente altamente conservate, presenti virtualmente in tutte le specie polliniche (i cosiddetti pan-allergeni, quali ad esempio profilina e polcalcine, che sono implicate rispettivamente nella *pollen-food syndrome* e nell'asma bronchiale).

Allergia alle graminacee

La risposta anticorpale nei confronti del polline delle graminacee (ad esempio, *Phleum pratense* e codolina), di solito evolve da uno stadio di sensibilizzazione IgE mono-molecolare ad uno stadio oligo-molecolare ed eventualmente ad uno poli-molecolare (11). Tale fenomeno è definito *molecular spreading* (sviluppo sequenziale della risposta IgE a molecole distinte non cross-reattive della stessa fonte antigenica a partire da una molecola allergenica "iniziatrice"). Nella maggior parte dei pazienti l'iniziatore è la molecola Phl p1; successivamente la risposta coinvolge le molecole Phl p4 e Phl p5, poi Phl p2 e Phl p11 ed in una fase finale i pan-allergeni Phl p12 (profilina) e Phl p7 (polcalcina).

È da notare che il processo di *molecular spreading* segue la sequenza in modo differente, cioè alcuni bambini restano sensibilizzati solo alla molecola iniziatrice, mentre altri si sensibilizzano ad alcune molecole o a tutte le altre. Di conseguenza, una popolazione di pazienti allergici alle graminacee apparentemente omogenea alla diagnostica con estratti è in realtà estremamente eterogenea quando analizzata a livello delle molecole allergeniche, con importanti implicazioni prognostico-terapeutiche.

Allergie alimentari

Le molecole allergeniche alimentari hanno una chiara associazione con i fenotipi clinici e la gravità dei sintomi (11). La maggior parte degli alimenti contiene diversi allergeni, di cui alcuni sono specie-specifici ed altri omologhi ad allergeni di fonti diverse e potenzialmente cross-reattivi. È importante rilevare che gli allergeni presentano caratteristiche chimico-fisiche diverse, con notevoli differenze a livello clinico e prognostico; per esempio, allergeni gastro-termolabili provocano sintomi localizzati al cavo orale solo se consumati crudi.

I meccanismi attraverso cui si diviene allergici sono tre: 1) diretta esposizione all'alimento per via orale o percutanea; 2) cross-reattività tra alimenti; 3) cross-reattività tra allergeni inalatori e alimentari (*pollen-food syndrome*, figura 2). Nell'ultimo caso, la sensibilizzazione a un alimento vegetale può avvenire per diretta sensibilizzazione al frutto stesso (allergia alimentare di classe 1, ad esempio, Pru p3 della pesca) o secondariamente alla sensibilizzazione ad un polline e cross-reattività nei confronti del frutto (allergia alimentare di classe 2, ad esempio Bet v1 della betulla e Pru p1 della pesca). Il primo caso è un profilo di sensibilizzazione alla *lipid transfer protein* (LTP) della pesca associato ad un alto rischio di reazioni sistemiche severe, mentre nel secondo caso si tratta di sindrome orale allergica (SOA) con sintomi lievi-moderati al cavo orale, per la labilità degli allergeni alla digestione ed al calore. Alcuni allergeni sono più pericolosi di altri, poiché possono elicitare reazioni allergiche più gravi; al contrario, non bisogna dimenticare che altri allergeni inducono IgE ma non scatenano sintomi, a causa di una cross-reattività IgE tra allergeni e glicoproteine.

ALLERGIA ALIMENTARE

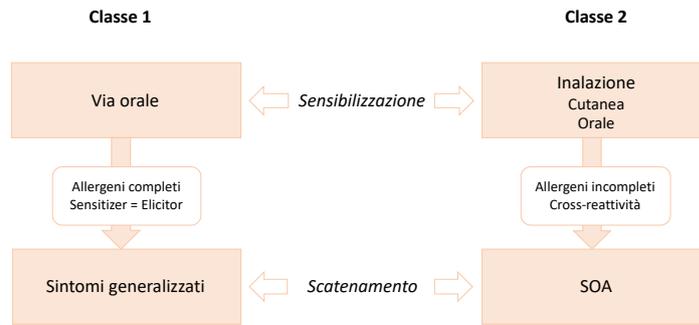


Fig. 2 Caratteristiche dell'allergia alimentare

Allergia alle arachidi

Un prototipo di fonte allergenica sono le arachidi, verso cui molte persone sviluppano IgE ma non sintomi clinici e pertanto possono consumarle liberamente. Clinicamente l'allergia alle arachidi si distingue in 3 *pattern* (figura 3):

- sensibilizzazione secondaria a molecole cross-reattive labili della famiglia della Bet v1 (Ara h8) o delle profiline (Ara h5), con sviluppo di sintomi generalmente lievi e localizzati al cavo orale (SOA) ed allergia alimentare di classe 2;
- sensibilizzazione ad LTP (Ara h9), secondaria alla sensibilizzazione a Pru p3 della pesca;
- sensibilizzazione ad allergeni stabili (proteine di deposito, oleosine o defensine), con manifestazioni cliniche immediate e sistemiche.

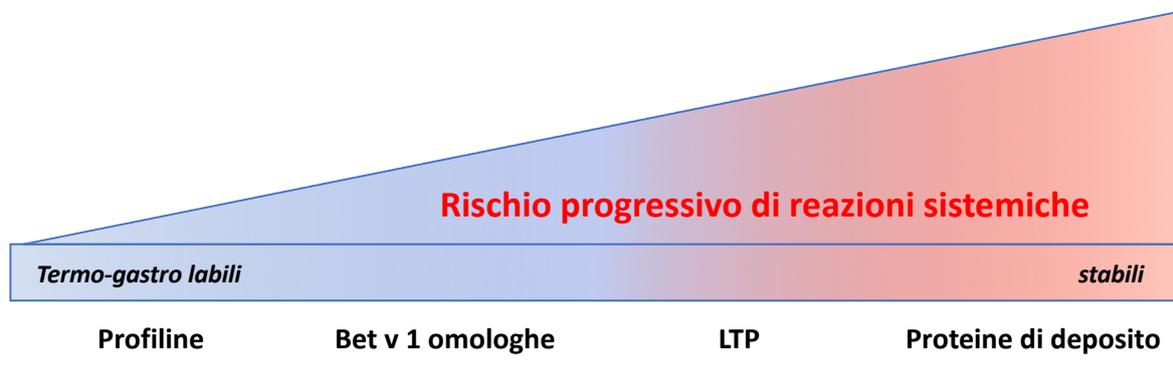


Fig. 3 Rilevanza clinica degli allergeni delle arachidi

QUANDO UTILIZZARE I TEST ALLERGOLOGICI IN VITRO E LA CRD?

I test allergologici *in vitro* devono essere eseguiti nei bambini che presentano storia clinica compatibile con allergia respiratoria o alimentare IgE-mediata (11). Possono essere utili talora anche nelle forme miste (dermatite atopica e gastro-enteropatia eosinofila) o nelle patologie allergiche non IgE-mediate (*food protein induced enterocolitis syndrome* o FPIES e proctocolite allergica), giacché tali quadri clinici possono essere associati a o evolvere con il tempo in manifestazioni IgE-mediate.

Perché utilizzare la CRD?

La diagnostica molecolare permette di differenziare i soggetti sensibilizzati verso molecole allergeniche indice di sensibilizzazione primaria (“genuina”) per una singola fonte allergenica

dai soggetti che sono positivi solo perché sensibilizzati a molecole cross-reattive (pan-allergeni) responsabili di false positività (12). La CRD presenta importanti ripercussioni sulle scelte terapeutiche e consente di predire il rischio nelle allergie alimentari, distinguendo tra sensibilizzazioni verso molecole stabili a calore e digestione peptica da quelle verso molecole labili (9). La CRD è quindi di grande utilità clinica nella gestione dell'allergia respiratoria, in quanto consente di effettuare una prescrizione precisa dell'immunoterapia allergene-specifica, unico trattamento in grado di modificare la storia naturale della malattia allergica. Nell'allergia alimentare, inoltre, permette di identificare la fonte allergenica e l'allergene responsabile della sintomatologia, di predire la gravità delle reazioni e la storia naturale, di prevenire sintomi di cross-reattività inattesi e di evitare restrizioni dietetiche inutili.

Come utilizzare la CRD?

È possibile ricercare le molecole allergeniche in due modi (11):

- 1) singolarmente, con metodica quantitativa *Single-plex*;
- 2) in modo associato, con metodica *Multiplex (microarray)*, che ha il vantaggio di ricercare numerose molecole allergeniche con una quantità minima di siero.

Quale approccio diagnostico utilizzare?

Non esiste una risposta definitiva a tale domanda. Le nuove tecnologie richiedono anni prima di essere completamente integrate nella pratica clinica. Gli specialisti, attualmente, si suddividono, in base al loro orientamento diagnostico, in due categorie. I primi utilizzano il cosiddetto approccio diagnostico *top-down*, preferendo un metodo induttivo che parte dalla storia clinica con *prick test* o analisi delle IgE su estratti e, quindi, l'uso dei test molecolari *single-plex* scelti dal medico; i restanti preferiscono, invece, i *microarray* per fornire una visione ampia e analitica del profilo di sensibilizzazione del paziente, definito come approccio *bottom-up*, partendo quindi dal *microarray* fino alla storia clinica (11). Questo problema è stato risolto dall'*European Academy of Allergy and Clinical Immunology* con la proposta di integrare i due orientamenti in un approccio *U-shaped*, secondo cui il paziente intraprende il *work-up* allergologico classico con esame fisico, *prick test* o IgE specifiche con estratti e molecole selezionate a seconda della storia clinica e dei risultati dei test con estratti (11). Nei pazienti in cui è descritta una sensibilizzazione IgE a molecole cross-reattive, si consiglia di testare la sensibilizzazione ad altre molecole della stessa famiglia con cross-reattività ristretta (ad esempio, proteine di accumulo dei semi) e di indagare con domande concernenti i sintomi scatenati da altre fonti allergeniche che contengono molecole della stessa famiglia. In conclusione, l'allergologia molecolare ha permesso di ottimizzare l'approccio diagnostico alle malattie allergiche offrendo una maggiore precisione ed una migliore efficacia dell'immunoterapia.

IL CASO

Rosa, 3 anni e 10 mesi di età, è giunta alla nostra osservazione per episodi ricorrenti di orticaria. A 2 anni e 10 mesi di vita aveva presentato il primo episodio di anafilassi, con orticaria, angioedema del volto e broncospasmo, dopo ingestione di arachidi. Era stato pertanto eseguito approfondimento allergologico, con riscontro ai *prick test* di positività per proteine del latte vaccino, albume e tuorlo d'uovo, arachidi, graminacee e parietaria. Nonostante la terapia antistaminica con cetirizina e la dieta di esclusione di frutta secca, la bambina ha continuato a presentare episodi ricorrenti di orticaria-angioedema senza correlazione con alcuna fonte allergenica specifica. Di conseguenza è stata effettuata diagnostica *in vitro*, che ha documentato la positività delle IgE specifiche per albume (5.20 kUA/L) e tuorlo d'uovo (1.99 kUA/L), caseina (1.22 kUA/L), alfa-latto-albumina (6.41 kUA/L), beta-latto-globulina (9.08 kUA/L), merluzzo (1.37 kUA/L), arachide (3.49 kUA/L), nocciola (4.84 kUA/L), semi di soia (0.71 kUA/L) e pomodoro (4.35 kUA/L); tra gli allergeni respiratori, si riscontrava positività per graminacee (1.58 kUA/L) e parietaria (0.91 kUA/L). A completamento dell'iter diagnostico, sono state escluse la malattia celiaca mediante lo screening sierologico, le tireopatie attraverso il dosaggio di TSH, FT4 ed anticorpi anti-tireoglobulina e anti-tireoperossidasi ed inoltre un'infezione da

Mycoplasma pneumoniae mediante sierologia. È stata instaurata terapia antistaminica con rupatadina ed intrapresa dieta di esclusione dapprima dell'uovo ed in seguito di latte vaccino, pesce e successivamente pomodoro, senza tuttavia una sostanziale riduzione della frequenza degli episodi. Pertanto, è stata effettuata una valutazione con *Immuno Solid-phase Allergen Chip* (ISAC), con riscontro di: negatività per caseina, alfa-lattoalbumina, beta-lattoglobulina, ovo-mucoide ed ovo-albumina; debole positività per Gal d3 (0.4 ISU-E), Bos d6 (0.6 ISU-E) e Ara h1 (0.8 ISU-E); forte positività per semi di soia (Gly m5 5.7 ISU-E e Gly m6 0.9 ISU-E). Per quanto riguarda le profiline, vi è stato riscontro di positività per Bet v2 (0.4 ISU-E) ed Hev b8 (1.2 ISU-E). Approfondendo ulteriormente l'anamnesi alimentare, i genitori hanno riferito che la bambina assumeva molti alimenti confezionati e che essi avevano inoltre sostituito per un certo periodo il latte vaccino con latte di soia. Da quando è stata intrapresa dieta di esclusione di tutti gli alimenti contenenti lecitina di soia oltre che di frutta secca, la bambina non ha presentato più episodi di orticaria-angioedema. Sono stati infine reintrodotti nella dieta il latte vaccino e l'uovo, senza alcun problema.

DISCUSSIONE

Alcuni soggetti affetti da sindromi allergiche presentano agli esami diagnostici una positività multipla per numerosi allergeni, spesso apparentemente molto diversi tra loro.

Pertanto, può essere difficile individuare l'allergene realmente responsabile dei sintomi ed i pazienti sono spesso sottoposti a terapie incongrue ed una dieta di esclusione di numerosi alimenti, riducendo considerevolmente la loro qualità di vita. La diagnostica molecolare permette di discriminare tra le componenti molecolari di una determinata fonte, identificando quelle responsabili della sensibilizzazione primaria, associando a ciascun allergene un potenziale rischio ed individuando una terapia mirata. Il *microarray* è stato sviluppato all'inizio del 2000 (13) e attualmente l'ISAC), basato su 112 diversi componenti molecolari relativi a 51 fonti allergeniche, è lo strumento diagnostico molecolare basato sul *microarray* più studiato e più frequentemente utilizzato. Il test necessita di una minima quantità di siero (20 µl) e richiede circa 5 ore. I risultati sono elaborati sotto forma di classi ISAC (assente, basso, medio ed alto) ed unità ISU, fornendo una determinazione delle IgE di tipo semi-quantitativo (14). Inoltre, recentemente è stato messo a punto da Macro-ArrayDX (Wien, Austria) un *chip* che combina la diagnostica di secondo e di terzo livello. Questo *chip* contiene 157 estratti di allergeni e 125 componenti molecolari e sembra essere l'*array* di allergeni più ampio attualmente disponibile (15).

IL CASO: LA RILEVANZA CLINICA DEL MICROARRAY

La lecitina usata industrialmente è isolata dalla soia o dal tuorlo d'uovo e può essere presente in centinaia di prodotti confezionati (torte, biscotti, merendine, pizze surgelate ed altro) (16). Il confezionamento industriale dei cibi ha amplificato la possibilità di reperire in modo del tutto inaspettato allergeni occulti, con conseguenti reazioni verso alimenti apparentemente innocui rispetto alle sensibilizzazioni note. Nel caso della soia, l'indicazione non è sempre chiara perché viene compresa sotto le voci "proteine vegetali", "olio vegetale" oppure "lecitina".

La soia è costituita per il 40% di proteine; 6 delle 28 proteine della soia sono state designate come allergeni maggiori (Gly m1-Gly m6). Gly m1 e Gly m2 sono particolarmente rilevanti nei lavoratori che presentano sintomi respiratori presso strutture di lavorazione della soia. Gly m3 (una profilina) e Gly m4 sono responsabili della *pollen-food syndrome* in pazienti sensibilizzati alla betulla (17). Tuttavia, la maggior parte del contenuto proteico è costituito dalle 2 proteine di stoccaggio (b-conglicina e glicina), Gly m5 e Gly m6, i cui livelli di IgE sono stati associati a gravi reazioni allergiche nei bambini (18) e sono responsabili della cross-reattività tra soia ed arachide (19).

Il sistema ISAC è dotato di elevata affidabilità diagnostica (20), possedendo il più alto valore predittivo negativo rispetto a qualsiasi altro test impiegato nella diagnostica allergologica (21,

22). Concludendo, l' ISAC, oltre a fornire un quadro ad ampio spettro in caso di anamnesi incompleta o insufficiente, può essere dirimente per chiarire il reale profilo di sensibilizzazione di un paziente polisensibilizzato, per rivelare il rischio potenziale delle specifiche reazioni allergiche e per verificare il profilo anticorpale IgE precedentemente ipotizzato in quei pazienti che presentano una risposta insoddisfacente al trattamento.

BIBLIOGRAFIA

- (1) American Academy of Allergy and Immunology. *Position Statement. The use of in vitro tests for IgE antibody in the specific diagnosis of IgE-mediated disorders and in the formulation of allergen immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol 1992; 90: 263-267.
- (2) Wide L, Bennich H, Johansson SG. *Diagnosis of allergy by an invitro test for allergen-specific IgE antibodies.* Lancet 1967; II: 1105-1107.
- (3) Hamilton RG, Adkinson NF. *In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders.* J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 213-225.
- (4) International Union of Immunological Societies. *Allergen Nomenclature. Allergen Nomenclature Sub-Committee.* From website: <http://www.allergen.org/List.htm> (ultimo accesso 1/09/2018)
- (5) Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, et al. *EAACI Molecular Allergology User's Guide.* Pediatr Allergy Immunol 2016; 23: 1-250.
- (6) Alessandri C, Ferrara R, Bernardi ML, et al. *Diagnosing allergic sensitizations in the third millennium: why clinicians should know allergen molecule structures.* Clin Transl Allergy 2017; 7: 21.
- (7) Dolen WK. *IgE antibody in the serum -detection and diagnostic significance.* Allergy 2003; 58: 717-723.
- (8) Aalberse RC. *Structural biology of allergens.* J Allergy Clin Immunol 2000; 106: 228-238.
- (9) Aalberse RC, Akkerdaas J, van Ree R. *Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens.* Allergy 2001; 56: 478-490.
- (10) Radauer C, Nandy A, Ferreira F, et al. *Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences.* Allergy 2014; 69: 413-419.
- (11) Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, et al. *EAACI Molecular Allergology User's Guide.* Pediatr Allergy Immunol 2016; 27: 1-250.
- (12) Stringari G, Tripodi S, Caffarelli C, et al. *The effect of component-resolved diagnosis on specific immunotherapy prescription in children with hay fever.* J Allergy Clin Immunol 2014; 134: 75-81.
- (13) Melioli G, Bonifazi F, Bonini S, et al. *The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms.* Clin Biochem 2011; 44: 1005-1011.
- (14) Alessandri C, Scala E, Zennaro D, et al. *La diagnostica molecolare in allergologia.* Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica 2010; 5: 11-20.
- (15) Heffler E, Puggioni F, Peveri S, et al. *Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis.* World Allergy Organ J 2018; 11:7.
- (16) Burney PG, Potts J, Kummeling I, et al. *The prevalence and distribution of food sensitization in European adults.* Allergy 2014; 69: 365-367.
- (17) Kattan JD, Cocco RR, Järvinen KM. *Milk soy allergy.* Pediatr Clin North Am 2011; 58: 407-426.
- (18) Ito K, Sjolander S, Sato S, et al. *IgE to Gly m 5 and Gly m 6 is associated with severe allergic reactions to soybean in Japanese children.* J Allergy Clin Immunol 2011; 128: 673-675.
- (19) Helm RM, Cockrell G, Stanley SJ, et al. *IgE binding of homologous legume vicilins and glycinins of soy bean and peanut allergens.* J Allergy Clin Immunol 1998; 101: 240.

- (20) Ebo DG, Hagendorens MM, Knop KJ, et al. *Component-resolved diagnosis from latex allergy by microarray*. Clin Exp Allergy 2010; 40: 348-358.
- (21) Ebo DG, Bridts CH, Verweij MM, et al. *Sensitization profiles in birch pollen-allergic patients with and without oral allergy syndrome to apple: lessons from multiplexed component-resolved allergy diagnosis*. Clin Exp Allergy 2010; 40: 339-347.
- (22) Jensen-Jarolim E, Jensen SAF. *Food allergies in the elderly: collecting the evidence*. Ann Allergy Asthma Immunol 2016; 117: 1-4.

Studi del sonno

Sleep studies

Ambra Nicolai¹, Alessandro Onofri²

¹ **Università della Campania “Luigi Vanvitelli” - Scuola di Specializzazione in Malattie dell’Apparato Respiratorio**

² **U.O.C. Broncopneumologia, Area Semintensiva Pediatrica, Dipartimento Pediatrico Universitario Ospedaliero, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS**

Corrispondenza: Ambra Nicolai **email:** ambra10.nic@gmail.com

Riassunto: I disturbi del sonno pediatrici hanno una prevalenza del 25%. I più frequenti sono i disturbi respiratori (DRS), di cui il maggiore rappresentante sono le apnee ostruttive del sonno (OSA), con una prevalenza dell’1-3%, che aumenta considerevolmente in caso di patologie genetiche (Sindrome di Down e di Prader-Willi). La fascia d’età maggiormente colpita è tra i 3 e i 6 anni; cause principali sono l’obesità, l’ipertrofia adeno-tonsillare e le malformazioni cranio-facciali. La sintomatologia notturna comprende il russamento, la presenza di pause respiratorie (apnee) e di frammentazione e agitazione del sonno. Segni diurni sono invece la sonnolenza, l’irritabilità e lo scarso rendimento scolastico. L’esame diagnostico *gold standard* è la polisonnografia eseguita in ambiente ospedaliero. Il trattamento prevede la perdita di peso, l’adeno-tonsillectomia e nei casi molto gravi la ventilazione meccanica a pressione continua. Il caso clinico presentato in questo articolo evidenzia l’importanza dello studio del sonno nell’ambito della valutazione multidisciplinare del paziente affetto da sindrome di Prader-Willi.

Parole chiave: disturbi del sonno, OSAS, polisonnografia, sindrome di Prader-Willi.

Summary Pediatric sleep disorders have a prevalence of 25% and sleep respiratory disorders (SRD) are the most frequent. The most representative is the Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS), with a prevalence of 1-3%, that increases considerably in case of genetic diseases (Sindrome di Down e di Prader-Willi). The most frequent age is between 3 and 6 years, and the main causes are represented by obesity, adeno-tonsillar hypertrophy and cranio-facial malformations. Nocturnal symptoms include snoring, respiratory pauses (apneas), and sleep fragmentation and agitation. Daytime symptoms are drowsiness, irritability, and poor academic performance. The gold standard diagnostic test is polysomnography performed in a hospital setting. The treatment involves weight loss, adeno-tonsillectomy and in very severe cases mechanical ventilation with continuous pressure. The case report herein described highlights the importance of sleep studies in the multidisciplinary evaluation of the patient affected by Prader-Willi syndrome.

Keywords: sleep disorders, OSAS, polysomnography, Prader-Willi syndrome.

INTRODUZIONE

Il sonno è definito come una sospensione reversibile dell’interazione sensitivo-motoria dell’individuo con l’ambiente esterno.

L’atto del dormire permette all’individuo di recuperare le energie spese durante le attività giornaliere (1).

I disturbi del sonno pediatrici creano un’interruzione del normale processo di sonno notturno e quindi una cattiva qualità del sonno stesso.

La prevalenza di tali disturbi nei bambini è di circa il 25% ed essi si dividono nelle seguenti categorie: insonnia, disturbi respiratori del sonno (DRS), iper-sonnolenza (narcolessia), disturbi del ritmo circadiano sonno-veglia, para-sonnie (*pavor nocturnus*, enuresi e sonniloquio) e disturbi del movimento legati al sonno (1, 2).

DISTURBI RESPIRATORI DEL SONNO (DRS) E SINDROME DELLE APNEE OSTRUTTIVE DEL SONNO (OSAS)

I principali DRS sono riassunti in tabella 1 (2-7).

Tab. 1: Disturbi respiratori del sonno (DRS)

Disturbo	Prevalenza	Caratteristiche
Russamento primario	1-27%	Rumori vibratori del palato molle per parziale ostruzione delle vie aeree superiori. Respirazione orale, bocca e labbra secche, alitosi, difetti della fonesi. Assenza di episodi di apnea/ipopnea, <i>arousals</i> e disordini dello scambio dei gas.
Sindrome da alterata resistenza delle alte vie aeree	1%	Russamento, aumento del lavoro respiratorio, <i>arousals</i> . Assenza di eventi ostruttivi e disordini dello scambio dei gas.
Apnee centrali del sonno - Sindrome da ipoventilazione centrale congenita (Sindrome di Ondine)	Sconosciuta Incidenza: 1/100.000 nati vivi	Esordio nei primi mesi di vita Perdita della capacità respiratoria per inadeguato funzionamento automatico dei chemorecettori centrali e/o periferici. Segni: cianosi, convulsioni, letargia, insufficienza cardio-respiratoria congestizia fino alla morte improvvisa in culla. L'esame obiettivo in veglia può essere normale Presenza di apnee centrali, assenza di sforzi inspiratori ed aumento della pCO ₂ di fine espirazione (<i>end-tidal CO₂</i>).
Sindrome delle apnee ostruttive del sonno (Obstructive Sleep Apnea)	1-3% Sindrome di Down 30-63% Sindrome di Prader-Willi 80% Pazienti Neuromuscolari 17% Epilessia 20-30%	Episodi ricorrenti di apnee/ipopnee con compromissione della normale ossigenazione e ventilazione e del <i>pattern</i> del sonno

L'OSAS è una patologia caratterizzata da episodi prolungati di parziale ostruzione e/o ostruzione completa intermittente (ipopnea o apnea, rispettivamente) delle vie aeree superiori.

Questi episodi interrompono e disturbano il normale *pattern* del sonno, che risulta frammentato da *arousals* (micro-risvegli), con conseguente ipossia intermittente; l'OSAS può essere complicata da ipercapnia (aumento della concentrazione di anidride carbonica nel sangue) (2, 5, 8, 9). Ad ogni apnea si possono associare o meno delle cadute della saturazione di ossigeno e delle variazioni della frequenza cardiaca. La principale causa favorente la riduzione di calibro delle alte vie aeree (naso, orofaringe ed ipofaringe) è la diminuzione del tono muscolare durante il sonno (3, 4, 6).

La maggiore prevalenza dell'OSAS si ha nei bambini tra i 3 ed i 6 anni; in questa fascia di età la più frequente causa di ostruzione è rappresentata dall'ipertrofia adeno-tonsillare, seguita da obesità, malocclusioni dentarie, rinite allergica con congestione nasale, malformazioni cranio-facciali (macroGLOSSIA e micrognazia), ipotonia e patologie neuromuscolari. Un secondo picco di frequenza è descritto durante l'adolescenza, in cui l'OSAS si manifesta con le caratteristiche della patologia dell'adulto (risvegli notturni e sonnolenza diurna) (2-4, 10, 11). Il segno prevalente nell'OSAS è il russamento, che può essere transitorio e risolversi spontaneamente oppure essere il primo segno della patologia.

Una storia di russamento non è sufficiente per la diagnosi e la sua assenza non esclude la diagnosi di OSAS. Altri segni notturni sono la respirazione orale, l'irregolarità e l'agitazione del sonno, episodi di cianosi, l'osservazione di apnee da parte dei genitori ed i movimenti paradossi del torace e dell'addome.

In molti casi i bambini affetti da OSAS tendono ad assumere posizioni particolari durante il sonno, come l'iperestensione del capo o una posizione seduta antiversa (2-4).

Segni diurni sono invece rappresentati da eccessiva sonnolenza, alterazioni dell'umore (irritabilità) e del comportamento (iperattività e comportamenti oppositivi) o delle funzioni cognitive (difficoltà di attenzione e concentrazione, scarso rendimento scolastico, ecc.) (2-4, 6, 8, 10).

In molti casi i bambini affetti da OSAS presentano anche disturbi della crescita, prevalentemente in altezza; la fisiopatologia di questa manifestazione è verosimilmente correlata con un ridotto introito calorico dovuto all'ipertrofia adenotonsillare, un aumento della spesa energetica dovuta allo sforzo respiratorio durante il sonno, un ridotto rilascio di ormone della crescita ed una resistenza periferica all'ormone della crescita (12). L'ipoventilazione (definita come presenza di ipercapnia per più del 25% della durata totale del sonno) viene attribuita all'OSAS, all'obesità oppure all'insufficienza ventilatoria e si manifesta con cefalea, astenia e sonnolenza (2, 10) Altre

complicanze dell'OSAS possono includere disturbi neurologici, disturbi cardiologici come l'ipertensione arteriosa e in casi molto gravi ipertrofia ventricolare destra ed ipertensione polmonare, oggi meno frequenti grazie alle diagnosi precoci ed a trattamenti più efficaci (8). La fisiopatologia con cui i DRS contribuiscono alla morbilità neurocomportamentale è prevalentemente ancora sconosciuta (2).

DIAGNOSI

Al fine di eseguire la diagnosi di OSAS si può ricorrere a differenti strumenti diagnostici (5, 6, 8, 13-18), riassunti in tabella 2.

Tab.2: *Esami strumentali per la diagnosi di OSAS*

Test diagnostico	Sensibilità – Specificità – Valore predittivo positivo – Valore predittivo negativo	Dettagli
Valutazione clinico anamnestica con test di screening Sleep Clinical Record	Score ≥ 6.5 Sensibilità 96%	Basata su esame obiettivo (ipertrofia adenotonsillare, ostruzione nasale, dismorfismi cranio-facciali, malocclusioni dentali, deficit dell'accrescimento/obesità) oltre che aspetti comportamentali (iperattività e disattenzione)
Registrazione audio/video	Sensibilità 71-94% Specificità 29-80% Valore predittivo positivo 50-75% Valore predittivo negativo 73-88%	Identifica il russamento notturno, senza distinzione tra russamento primario e russamento associato ad OSAS. Esame di selezione per i pazienti sintomatici.
Test di latenza multipla del sonno (Multiple Sleep Latency Test)	Sensibilità 79-100%	Usato nello studio delle ipersonnie, in particolare nella narcolessia. Misura standardizzata della tendenza ad addormentarsi durante le ore di veglia e valutazione della velocità con la quale il paziente si addormenta. Test semplice e non invasivo. Se l'esordio del sonno avviene in meno di 5 minuti dalla chiusura degli occhi, il risultato è patologico.
Pulsossimetria notturna	Sensibilità 75% (80-88% se associata con valutazione della frequenza cardiaca) Specificità 60-99% Valore predittivo positivo 84-98%	Test di <i>screening</i> abbreviato. Semplice da eseguire ed economico. Si effettua attraverso un sensore applicato all'unghia di un dito e permette di registrare le desaturazioni durante la notte. Un indice di desaturazione >2 /ora è predittivo di OSAS. Le desaturazioni correlano con la presenza di apnee, ma in casi particolari (obesità o Sindrome di Down) le desaturazioni possono essere associate con ipossia legata al sonno anche senza OSAS.
Polisonnografia abbreviata (Nap)	Valore predittivo positivo 77-99% Valore predittivo negativo 17-49%	Condotta durante un breve sonno diurno del bambino. Semplice da eseguire. I risultati sono utili se positivi, ma possono sottostimare la gravità del disturbo in quanto il risultato può essere influenzato dalla ridotta durata del sonno e dal ridotto sonno REM.
Polisonnografia ambulatoriale (monitoraggio cardio-respiratorio)	Sensibilità 88% Specificità 98%	Condotta a domicilio. Valuta: flusso aereo (con termistore), russamento, movimenti toraco-addominali, elettrocardiogramma (ECG), posizione e ossimetria.
Capnografia (end tidal CO₂)	Sensibilità 88-100% Specificità 95-100%	Monitoraggio indiretto della concentrazione o della pressione parziale dell'anidride carbonica nel sangue arterioso.
Polisonnografia notturna	<i>Gold standard</i>	Permette una valutazione oggettiva e quantitativa del disturbo respiratorio e del <i>pattern</i> del sonno (con ECG). Accurata stratificazione dei pazienti in termini di gravità.

La polisonnografia notturna (PSG) è l'esame *gold standard*, raccomandato dall'*American Academy of Pediatrics*, per l'inquadramento diagnostico e la definizione di severità dell'OSAS in età pediatrica. Essa permette una valutazione oggettiva e quantitativa del disturbo respiratorio e del *pattern* durante il sonno ed un'accurata stratificazione dei pazienti in termini di gravità. Ciò aiuta a determinare quali bambini potrebbero essere maggiormente a rischio di

sequele o complicanze post-operatorie o addirittura di presentare OSAS residua dopo trattamento chirurgico e quali potrebbero beneficiare di trattamento con ventilazione non invasiva. La strumentazione della PSG prevede la registrazione dell'andamento del sonno attraverso l'elettroencefalogramma (EEG) e la valutazione dei movimenti oculari (elettroculogramma), dei movimenti muscolari del mento e delle gambe (elettromiogramma, EMG), del respiro (mediante sensore di flusso oro-nasale) e dei movimenti del torace e dell'addome (attraverso due fasce applicate rispettivamente al torace e all'addome); inoltre, viene registrata l'ossigenazione del sangue con il pulsossimetro e la frequenza cardiaca con l'elettrocardiogramma (ECG). È raccomandato che una PSG pediatrica sia analizzata usando i criteri pediatrici previsti nell'"American Academy of Sleep Medicine (AASM) scoring manual":

- **PARAMETRI EEG** – l'EEG permette di studiare l'architettura del sonno ed è variabile con l'età. Dai 2 mesi il sonno del bambino si divide in fase W (dormiveglia – caratterizzata da occhi aperti, vocalizzi/pianto, movimenti REM degli occhi, attività muscolare del mento e respiro irregolare), fase N1 (NREM 1), fase N2 (NREM 2), fase N3 (NREM 3) - tutte caratterizzate da occhi chiusi, nessun movimento degli occhi e respiro regolare - e fase R (REM – caratterizzata da un basso movimento del mento all'EMG, occhi chiusi con almeno un movimento oculare rapido, respiro irregolare, suzione ed EEG a bassa tensione). La percentuale di tempo REM rispetto al tempo di sonno totale diminuisce con l'aumentare dell'età, raggiungendo il suo picco a 12 mesi.
- **AROUSALS** – Gli *arousals* ("risvegli") avvengono nelle fasi N1, N2 e N3 o R e si manifestano con brusche modifiche della frequenza dell'EEG, che durano almeno 3 secondi preceduti da almeno 10 secondi di sonno stabile.
- **PARAMETRI RESPIRATORI** - l'AASM distingue gli eventi respiratori in apnee centrali, ostruttive o miste ed ipopnee. L'apnea ostruttiva è definita come una caduta >90% dell'ampiezza del flusso oro-nasale basale per più del 90% dell'intero evento, associata a movimenti del torace e dell'addome e di durata di almeno due atti respiratori. L'apnea centrale è definita come assenza di flusso con cessazione dello sforzo respiratorio della durata di almeno 20 secondi o di almeno 2 respiri, associata ad *arousal* o ad una desaturazione >3%. Le apnee miste sono definite come apnee che cominciano con un *pattern* centrale e terminano con un *pattern* ostruttivo [rientrano nel conteggio dell'indice di apnea/ipopnea (AHI)]. Un evento si definisce ipopnea se avviene una riduzione del segnale della traccia del flusso oro-nasale $\geq 30\%$ per una durata pari ad almeno 2 atti respiratori ed in associazione ad *arousal* e ad una de-saturazione $\geq 3\%$. Anche le ipopnee possono essere distinte in ostruttive (in presenza di russamento o movimento paradossale toraco-addominale) o centrali nel caso in cui non sia presente alcuno dei criteri per la definizione di ipopnea ostruttiva. Gli eventi ostruttivi nei bambini solitamente avvengono nella fase REM del sonno. Un AHI >1 evento/ora è considerato patologico. Il valore dell'AHI permette anche una stratificazione di gravità dell'OSA (OSA lieve, $1 \leq \text{AHI} \leq 3 + \text{end tidal CO}_2 < 55 \text{ mmHg} + \text{SpO}_2 > 92\%$; OSA moderata, $4 \leq \text{AHI} \leq 9 + > 55 < \text{end tidal CO}_2 \leq 60 \text{ mmHg} + \text{SpO}_2 > 80\%$; OSA grave, $\text{AHI} \geq 10 + \text{end tidal CO}_2 > 60 \text{ mmHg} + \text{SpO}_2 < 80\%$). Opzionale è la valutazione dei *Respiratory Effort-Related Arousals* (RERAs), caratterizzati da una sequenza di respiri (della durata di almeno 2 atti respiratori) che non rispettino i criteri di apnea o ipopnea e che conducano ad un *arousal*, ma che siano legati con un aumento dello sforzo respiratorio, un appiattimento della porzione inspiratoria della curva respiratoria, russamento e un aumento dell'*end-tidal pCO₂* rispetto al valore basale. L'ipo-ventilazione viene definita come la presenza di una $\text{pCO}_2 > 50 \text{ mmHg}$ (monitorata con emo-gasanalisi o con capnografia) per una durata >25% del tempo di sonno totale. Infine, il respiro periodico è definito come almeno 3 episodi di apnee centrali della durata di almeno 3 secondi separati da almeno 20 secondi di respiro normale. Esso differisce dal respiro di Cheyne-Stokes poiché quest'ultimo ha un tipico andamento "crescente e calante".

TRATTAMENTO DELL'OSA

- In caso di obesità è consigliabile la perdita di peso.
- Nelle forme di lieve entità è possibile eseguire una terapia medica che si basa sull'uso di cortisonici per via nasale per periodi non prolungati (associabile eventualmente ad un anti-leucotrienico).
- Intervento di adeno-tonsillectomia (asportazione di adenoidi e tonsille) - è il trattamento di prima scelta nei bambini con apnea ostruttiva da ipertrofia adeno-tonsillare;
- Altre chirurgie (chirurgia nasale, ugulo-palato-faringo-plastica, tonsillectomia linguale, chirurgia della base della lingua e sopra-glottoplastica) dopo valutazione specialistica oto-rino-laringoiatrica o maxillo-facciale.
- In tutti i casi di malocclusioni primitive, terapia ortognatodontica con correzione della posizione anomala di uno o più elementi dentali ed eventuale rimodellamento chirurgico della mandibola se indicato dall'odontoiatra. Anche l'espansore palatale rapido è utilizzato per la cura delle OSA e del russamento nel paziente in età evolutiva.
- Ventilazione meccanica continua a pressione positiva (CPAP). In tutti i casi moderati e severi in cui la terapia comportamentale, medica e chirurgica non abbia portato miglioramento dello stadio dell'OSAS o in caso di controindicazioni alla chirurgia ed in tutti quei casi in cui, oltre alle apnee ed alle desaturazioni, si associ anche ipercapnia può essere necessaria, durante il sonno, una ventilazione non invasiva con pressioni positive per mezzo di una maschera nasale/oronasale o facciale (CPAP). Tale apparecchiatura eroga una costante pressione positiva, regolata dal medico, che permette di mantenere pervie le alte vie aeree (10, 19, 20).

In figura 1 è riassunto l'iter diagnostico-terapeutico per i DRS.

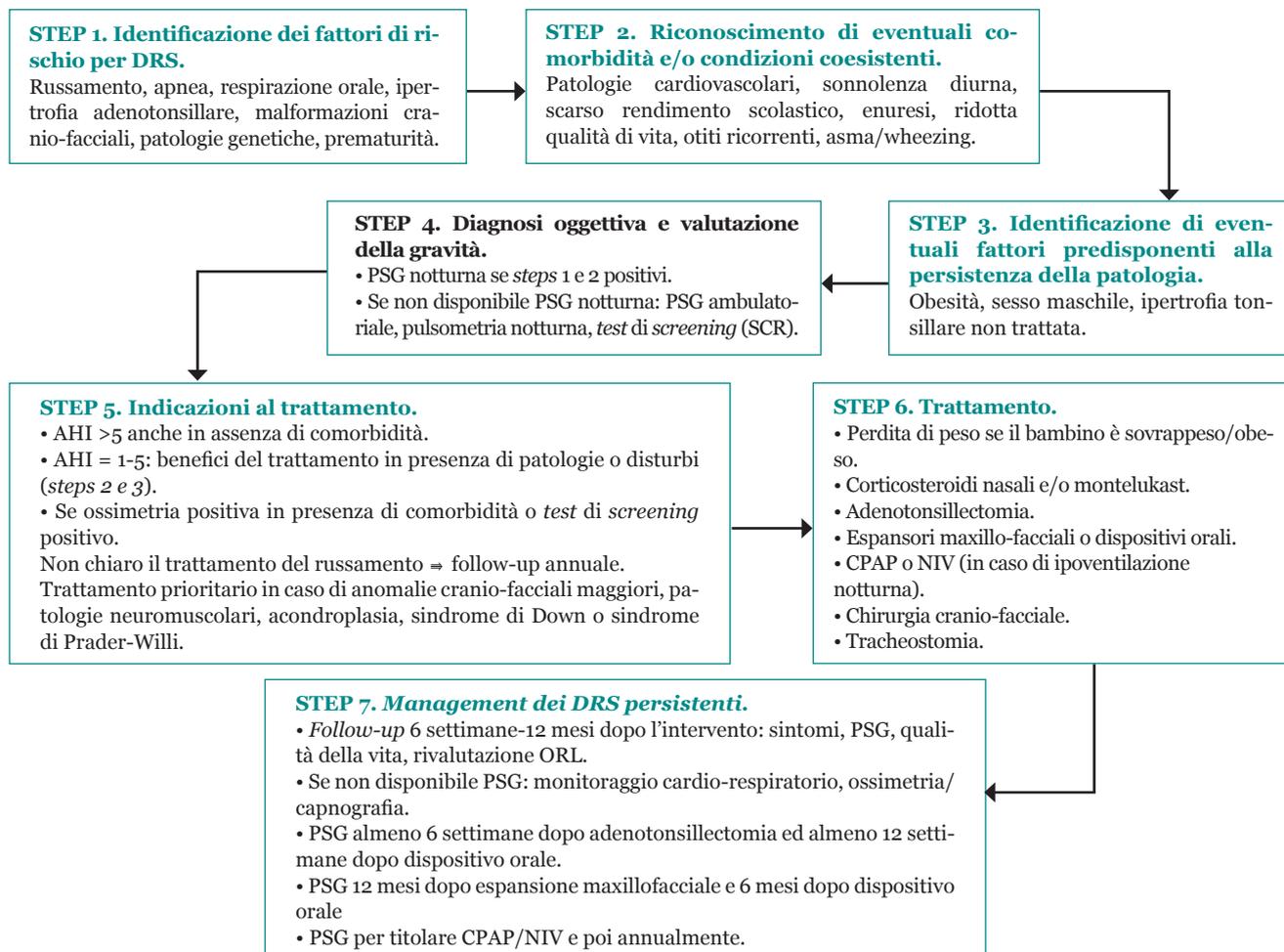


Fig. 1: Flow-chart dell'iter diagnostico-terapeutico per i disturbi respiratori del sonno.

A.R. è una bambina nata a termine a 39 settimane di età gestazionale, da parto eutocico e con peso alla nascita di 3125 grammi. Durante il periodo neonatale, per il riscontro di ipotonia marcata con difficoltà durante la suzione, la bambina era stata sottoposta a numerosi accertamenti ed all'età di 9 mesi era stata posta diagnosi di sindrome di Prader-Willi (PWS), malattia genetica causata dalla microdelezione del braccio lungo del cromosoma 15. A 12 mesi di vita la piccola veniva sottoposta a terapia con ormone della crescita (GH). Nei mesi successivi, dopo un iniziale beneficio durante la terapia ormonale, la bambina presentava russamento notturno, apnee durante la notte, peggioramento del reflusso gastro-esofageo, irrequietezza diurna e sonno frastagliato da numerosi risvegli.

La bambina, giunta alla nostra osservazione all'età di due anni e nove mesi inviata dall'unità di Endocrinologia del nostro nosocomio, eseguiva poligrafia notturna in respiro spontaneo in aria ambiente. Tale indagine evidenziava un numero di apnee/ipopnee ostruttive e miste altamente significativo (MOAHI, 24.7), in presenza di significative desaturazioni (numero di desaturazioni <3%/ora: 14.9) fino a SpO₂ 48% e con valori di CO₂ ai limiti della norma.

In considerazione della patologia di base e dei possibili effetti collaterali del GH, che slatentizza disturbi respiratori ostruttivi del sonno in quanto induce ipertrofia adeno-tonsillare, la bambina era valutata con radiografia laterale del collo, endoscopia rino-faringo-laringea durante il sonno e rivalutazione dello specialista otorinolaringoiatra, con riscontro di ipertrofia adenoidea e tonsillare di terzo grado. Si decideva, pertanto, di sospendere la terapia con GH e di sottoporre la bambina ad intervento di adeno-tonsillectomia. Dopo l'intervento, si è ottenuto un notevole miglioramento clinico, con maggiore durata del riposo notturno, minori risvegli e sonno maggiormente ristoratore. Veniva quindi rivalutata a sei mesi di distanza dall'intervento e prima di una eventuale ripresa della terapia con GH con una nuova poligrafia notturna. L'indagine documentava un notevole miglioramento del numero di apnee/ipopnee ostruttive e miste durante il sonno (MOAHI, 1.7) in assenza di desaturazioni altamente significative. In accordo con gli specialisti endocrinologi, si decideva di riprendere la terapia con GH e di rivalutare la bambina dopo un anno. Dalla ripresa del GH vi era stata una ripresa dei sintomi notturni. La ripetizione della poligrafia confermava l'incremento delle apnee notturne, con un quadro di OSAS di grado severo (MOAHI, 17.4). La decisione di iniziare un trattamento ventilatorio veniva anche in questo caso presa collegialmente. La presenza di OSAS di grado severo dopo intervento chirurgico di adeno-tonsillectomia, unitamente alla necessità di proseguire la terapia con GH, determinavano la scelta di supportare la paziente con ventilazione meccanica non invasiva. In considerazione dei valori di CO₂ nella norma, la bambina era inizialmente sottoposta a CPAP (5 cmH₂O) con maschera nasale. La poligrafia notturna documentava un miglioramento delle apnee notturne di tipo ostruttivo (MOAHI, 4.7), ma contestualmente avvenivano due eventi: da una parte, un lieve incremento del numero di apnee centrali per ora di sonno (1.7), dall'altra, l'aumento, seppure lieve, della CO₂ alla capnografia transcutanea (CO₂ media, 47 mmHg; tempo di CO₂ >50 mmHg durante il tempo totale di sonno, 18%). In considerazione della patologia di base e del peggioramento della poligrafia notturna, con aggravamento dell'ipo-ventilazione in corso di CPAP, nonché della slatentizzazione delle apnee centrali, si decideva di iniziare trattamento ventilatorio con modalità pressometrica temporizzata per garantire maggiore stabilità del supporto respiratorio notturno e maggiore assistenza alla ventilazione della paziente. La ventilazione meccanica non invasiva veniva impostata in modalità *pressure support ventilation*) con graduale titolazione del *setting* ventilatorio fino ad arrivare ad un'impostazione ben tollerata da parte della paziente, con IPAP di 14 cmH₂O, EPAP di 5 cmH₂O e frequenza respiratoria di 18 atti/minuto. L'ultima poligrafia eseguita evidenziava normalizzazione dei valori di CO₂, con persistenza di minimi eventi apnoici residui notturni (MOAHI, 1.7) in assenza di desaturazioni significative.

La paziente ha potuto pertanto proseguire la terapia con GH senza ulteriori complicanze, con buona risposta clinica, ed attualmente prosegue ventilazione non invasiva notturna con periodiche rivalutazioni del *setting* in considerazione della crescita staturo-ponderale e della patologia di base.

DISCUSSIONE

La PWS è solitamente causata dall'assenza di espressione del gene paterno attivo sul braccio lungo del cromosoma 15 (15q11-q13). Quando, come nel caso clinico presentato, l'esordio è neonatale, solitamente le caratteristiche principali della patologia sono ipotonia marcata con difficoltà durante la suzione e l'alimentazione, scarso accrescimento, pianto debole, ipoplasia genitale e ritardo dell'acquisizione delle tappe dello sviluppo psico-motorio. Nel tempo i bambini affetti da PWS sviluppano iperfagia con progressiva obesità, bassa statura e, successivamente, ipogonadismo, scoliosi, disturbi del comportamento e difficoltà nell'apprendimento (21).

I pazienti affetti da PWS presentano elevato rischio di sviluppare DRS, che comprendono apnee ostruttive, apnee centrali, ipo-ventilazione notturna ed *arousals* anormali durante la notte. Le cause dei DRS nei pazienti affetti da PWS sono diverse e spesso in stretta correlazione tra loro. L'anatomia facciale e faringea determina riduzione dello spazio aereo, aggravata dall'ipotono, talvolta severo, che spesso rappresenta il sintomo cardine dei casi più precoci. L'ipotono ha un ruolo determinante nell'ipo-ventilazione notturna, che è aggravata da una ridotta risposta ventilatoria all'ipercapnia, con *arousals* notturni frequenti. L'iperfagia che si presenta nel tempo determina obesità, che concorre all'instaurarsi di un quadro di apnee ostruttive. Come già detto, sia la patologia stessa sia, in misura maggiore, la terapia con GH, concorrono a determinare ipertrofia adeno-tonsillare. Infine, l'alterato controllo della ventilazione determina un aumento del numero di apnee centrali, a seguito dell'alterata risposta ad ipossiemia ed ipercapnia prevalentemente durante il sonno REM; ridurre il numero di apnee ostruttive in alcuni casi determina la slatentizzazione degli eventi centrali (22-24).

I bambini affetti da PWS sono candidati a trattamento con GH. Tale terapia, nel tempo, è stata gravata da alcuni decessi improvvisi incorsi nei tre mesi successivi all'inizio della terapia. Stante la provata sicurezza del farmaco in studi successivi, il GH ha dimostrato di esercitare diversi effetti sui DRS: 1) peggiora l'ipertrofia adeno-tonsillare attraverso la via dell'IGF-1; 2) potenzialmente peggiora le apnee centrali nei bambini molto piccoli; 3) può determinare un'ulteriore riduzione dello spazio aereo delle alte vie aeree, aggravando il quadro delle apnee ostruttive notturne, se vi è combinazione tra l'inizio della terapia con GH ed un evento acuto che determina incremento del volume adeno-tonsillare (25, 26.) Tali evidenze hanno portato la FDA a dichiarare che la terapia con GH è controindicata in pazienti con gravi problematiche respiratorie ed obesità severa. Pertanto, tutti i pazienti devono essere valutati per escludere la presenza di apnee ostruttive severe prima del trattamento con GH (27).

Il caso clinico presentato dimostra l'importanza della valutazione poligrafica non solo prima del trattamento con GH, ma anche durante tale terapia. Come detto, attraverso la via dell'IGF-1, la terapia con GH determina ipertrofia adeno-tonsillare, in alcuni casi anche severa (28). Nel caso presentato, tale riscontro è stato essenziale per intervenire chirurgicamente tempestivamente e quindi riprendere la terapia con GH. Tuttavia, come nella popolazione generale, da una parte l'intervento di adeno-tonsillectomia può non essere totalmente risolutivo, in particolare nei bambini di età inferiore ai tre anni, e dall'altra la terapia con GH determina ulteriore incremento delle dimensioni di adenoidi e tonsille, con necessità di modificare l'approccio per risolvere il problema delle OSAS. Nel nostro caso, inoltre, la bambina, durante il trattamento con GH ed una volta iniziata la CPAP, ha presentato un altro evento avverso che si correla alla terapia nei pazienti affetti da PWS: la slatentizzazione delle apnee centrali.

In conclusione, lo studio del sonno assume un ruolo cruciale a più livelli nella PWS: prima dell'inizio del trattamento con GH, durante il periodo di trattamento (in particolare nel primo anno) ed in caso di effetti collaterali secondari alla terapia, caso in cui pone l'indicazione a procedere ad interventi correttivi che consentano la prosecuzione della terapia stessa. La gestione della terapia e delle indagini deve essere sempre affidata ad un team multidisciplinare, capace di effettuare interventi correttivi idonei per valutare da una parte l'efficacia della terapia, dall'altra l'eventuale presenza di fattori di rischio che rendano la terapia poco sicura o controindicata per il paziente.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Ophoff D, Slaats MA, Boudewyns A, et al. *Sleep disorders during childhood: a practical review*. Eur J Pediatr 2018; 177: 641-648.
- (2) Maski K, Owens J. *Pediatric Sleep Disorders*. Continuum (Minneapolis) 2018; 24: 210-227.
- (3) Kaditis AG, Alonso Alvarez ML, Boudewyns A, et al. *ERS statement on obstructive sleep disordered breathing in 1-to 23-month-old children*. Eur Respir J 2017; 7: 50.
- (4) Kaditis AG, Alonso Alvarez ML, Boudewyns A, et al. *Obstructive sleep disordered breathing in 2- to 18-year-old children: diagnosis and management*. Eur Respir J 2016; 47: 69-94.
- (5) Section on Pediatric Pulmonology, Subcommittee on Obstructive Sleep Apnea Syndrome. American Academy of Pediatrics. *Clinical practice guideline: diagnosis and management of childhood obstructive sleep apnea syndrome*. Pediatrics 2002; 109: 704-712.
- (6) Kothare SV, Rosen CL, Lloyd RM, et al. *Quality measures for the care of pediatric patients with obstructive sleep apnea*. J Clin Sleep Med 2015; 11: 385-404.
- (7) Zaidi S, Gandhi J, Vatsia S, et al. *Congenital central hypoventilation syndrome: An overview of etio-pathogenesis, associated pathologies, clinical presentation, and management*. Auton Neurosci 2018; 210: 1-9.
- (8) Marcus CL, Brooks LJ, Draper KA, et al. *Diagnosis and management of childhood obstructive sleep apnea syndrome*. Pediatrics 2012; 130: e714-755.
- (9) Kirk V, Baughn J, D'Andrea L, et al. *American Academy of Sleep Medicine Position Paper for the Use of a Home Sleep Apnea Test for the Diagnosis of OSA in Children*. J Clin Sleep Med 2017; 13: 1199-1203.
- (10) Ehsan Z, Ishman SL. *Pediatric Obstructive Sleep Apnea*. Otolaryngol Clin North Am 2016; 49: 1449-1464.
- (11) Loekmanwidjaja J, Carneiro ACF, Nishinaka MLT, et al. *Sleep disorders in children with moderate to severe persistent allergic rhinitis*. Braz J Otorhinolaryngol 2018; 84: 178-184.
- (12) Park DY, Choi JH, Kang SY, et al. *Correlations between pediatric obstructive sleep apnea and longitudinal growth*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2018; 106: 41-45.
- (13) Villa MP, Pietropaoli N, Supino MC, et al. *Diagnosis of Pediatric Obstructive Sleep Apnea Syndrome in Settings With Limited Resources*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg 2015; 141: 990-996.
- (14) Smith LA, Dawes PJ, Galland BC. *The use of pulse transit time in pediatric sleep studies: A systematic review*. Sleep Med Rev 2018; 37: 4-13.
- (15) Alonso-Álvarez ML, Terán-Santos J, Ordax Carbajo E, et al. *Reliability of home respiratory polygraphy for the diagnosis of sleep apnea in children*. Chest 2015; 147: 1020-1028.
- (16) Aurora RN, Lamm CI, Zak RS, et al. *Practice parameters for the non-respiratory indications for polysomnography and multiple sleep latency testing for children*. Sleep 2012; 35: 1467-1473.
- (17) Berry RB, Brooks R, Gamaldo C, et al. *AASM scoring manual updates for 2017 (Version 2.4)*. J Clin Sleep Med 2017; 13: 665-666.
- (18) Beck SE, Marcus CL. *Pediatric polysomnograph*. Sleep Med Clin 2009; 4: 393-406.
- (19) Pabla L, Duffin J, Flood L, et al. *Paediatric obstructive sleep apnoea: is our operative management evidence-based?* J Laryngol Otol 2018; 132: 293-298.
- (20) Reckley LK, Fernandez-Salvador C, Camacho M. *The effect of tonsillectomy on obstructive* Nat Sci Sleep 2018; 10: 105-110.
- (21) Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, et al. *Prader-Willi syndrome*. Genet Med 2012; 14: 10-26.
- (22) Nixon GM, Brouillette RT. *Sleep and breathing in Prader-Willi syndrome*. Pediatr Pulmonol 2002; 34: 209-217.
- (23) Pavone M, Caldarelli V, Khirani S, et al. *Sleep disordered breathing in patients with Prader-Willi syn-*

drome: A multicenter study. *Pediatr Pulmonol* 2015; 50: 1354-1359.

- (24) Urquhart DS, Gulliver T, Williams G, et al. *Central sleep-disordered breathing and the effects of oxygen therapy in infants with Prader-Willi syndrome.* *Arch Dis Child* 2013; 98: 592-595.
- (25) Miller J, Wagner M. *Prader-Willi syndrome and sleep-disordered breathing.* *Pediatr Ann* 2013; 42: 200-204.
- (26) Miller J, Silverstein J, Shuster J, et al. *Short-term effects of growth hormone on sleep abnormalities in Prader-Willi syndrome.* *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 413.
- (27) Deal CL, Tony M, Höybye C, et al. *2011 Growth Hormone in Prader-Willi Syndrome Clinical Care Guidelines Workshop Participants. Growth Hormone Research Society workshop summary: consensus guidelines for recombinant human growth hormone therapy in Prader-Willi syndrome.* *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: e1072-1087.
- (28) Nixon GM, Rodda CP, Davey MJ. *Longitudinal Association between Growth Hormone Therapy and Obstructive Sleep Apnea in a Child with Prader-Willi Syndrome.* *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 29-33.
- (29) Reckley LK, Fernandez-Salvador C, Camacho M. *Sleep apnea: an overview of systematic reviews.* *Nat Sci Sleep* 2018; 10: 105-110.

Indagine sulla formazione in pneumologia pediatrica nelle scuole di specializzazione in pediatria

Education in pediatric pulmonology: a survey in the Italian schools of pediatrics

Maria Di Cicco¹, Valeria Caldarelli², Sylvie Tagliati³, Vincenzo Insinga⁴, Roberto Raschetti⁴, Renato Cutrera⁵

¹ *Sezione di Pneumologia ed Allergologia Pediatrica, UO Pediatria 1, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa*

² *Unità Operativa Complessa di Pediatria, Arcispedale Santa Maria Nuova – IRCCS, Reggio Emilia*

³ *Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università degli studi di Ferrara, Ferrara*

⁴ *Osservatorio Nazionale Specializzandi Pediatria*

⁵ *UOC Broncopneumologia pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma*

Corrispondenza Maria Di Cicco **email:** mariaelisa.diccco@gmail.com

Riassunto Background Sebbene le malattie respiratorie rappresentino uno dei principali motivi di visita pediatrica, nel nostro paese la formazione in quest'ambito è attuata in maniera disomogenea. Scopo dell'indagine è stato descrivere lo stato dell'arte della formazione in pneumologia pediatrica nelle scuole di specializzazione in pediatria.

Materiali e Metodi: Abbiamo realizzato una *survey* composta di 25 *item* e l'abbiamo resa accessibile *online* per 2 mesi, comunicandone le modalità di accesso a tutti gli specializzandi in pediatria mediante *mailing list* e *newsletter* di SIMRI, ONSP (Osservatorio Nazionale Specializzandi Pediatria) e *Forum Junior Members* SIMRI.

Risultati: Hanno partecipato all'indagine 182 specializzandi da 16 regioni. Nessuno riteneva la propria preparazione in ambito pneumologico ottima. Lezioni e tirocini sono diffusi nelle scuole, a differenza di *journal club* e discussione di casi clinici. Spesso non è disponibile alcuna attività formativa relativa a radioprotezione (85.2%) e fisioterapia respiratoria (71.4%). Uno pneumologo pediatrico è presente nell'83% dei casi. I test più diffusi sono: spirometria (97.8%), test del sudore (94%) e pH-metria (78.6%), ma la relativa formazione è attuata capillarmente solo per la spirometria (87.9%). Solo il 7.7% del campione è molto soddisfatto del piano formativo della propria scuola, mentre il 45.6% lo è abbastanza, il 40.1% poco ed il 6.6% per niente. L'84% ritiene fondamentali gli anni della specializzazione per la formazione sub-specialistica.

Conclusioni: La nostra indagine suggerisce che nelle scuole di specializzazione in pediatria la formazione pneumologica deve essere incrementata.

Parole chiave: Pneumologia pediatrica, formazione, scuole di specializzazione

Summary: Background Pediatric respiratory diseases represent one of the main causes of pediatric consultation. However, education in this field is not equally provided in the Italian pediatrics residency programs. Aim of this study was to describe the current pediatric pulmonology education in the Italian postgraduate schools of pediatrics.

Methods: We created a 25 items survey and made it available online for 2 months, distributing the link to all the pediatrics residents through the mailing lists and newsletters of SIMRI, SIMRI Junior Members Forum and ONSP.

Results: One hundred eighty-two residents from 16 Italian regions participated to the survey. No resident judged the preparation in pediatric pulmonology excellent. Lectures and practical training are usually available in the schools, but not journal clubs and discussion of clinical cases. Many residents reported that there isn't any kind of education in fields like radioprotection (85.2%) and chest physiotherapy (71.4%). A pediatric pulmonologist is present in 83% of the cases. The most available diagnostic tests are spirometry (97.8%), sweat test (94%) and pH-metry (78.6%), but residents are trained mostly on spirometry (87.9%). Only 7.7% is very satisfied with the pulmonology program of the school, while 45.6% is enough satisfied, 40.1% not so much, and 6.6% not satisfied at all. Eighty-four percent of the residents believe that training in the schools is the most important activity to become a good pediatric pulmonologist.

Conclusions: Our survey suggests the need to improve the pediatric pulmonology education in the Italian postgraduate schools of pediatrics.

Key Words: Pediatric Pulmonology, Education, Postgraduate Schools of Pediatrics

INTRODUZIONE

Le malattie respiratorie sono le malattie pediatriche più comuni e le infezioni respiratorie ricorrenti ne costituiscono l'esempio tipico, soprattutto nei primi anni di vita, rappresentando uno dei principali motivi di richiesta di visita pediatrica. In Italia si stima che almeno il 6% dei bambini di età inferiore ai 6 anni vada incontro a questa problematica, incidendo in maniera significativa in termini di costi per il nostro sistema sanitario nazionale e di ore di lavoro perse da parte dei genitori (1). La pneumologia pediatrica è, tuttavia, una branca "giovane", a cui medici e pediatri hanno iniziato ad interessarsi solo negli anni '40. Ad oggi, per diventare specialista in malattie respiratorie infantili nel nostro paese, è necessario intraprendere un percorso tortuoso e non ben definito.

Dopo aver conseguito la laurea in medicina, infatti, il giovane medico dovrà innanzitutto affrontare un concorso nazionale per entrare in una scuola di specializzazione in pediatria, i cui posti disponibili sono stabiliti ogni anno sulla base del fabbisogno reale dal Ministero della Salute e dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca insieme alle regioni.

Una volta entrato nella Scuola, il medico in formazione specialistica (lo "specializzando") sarà formato mediante un programma che segue il modello dell'*European Union of Medical Specialists* (UESM) (2), prevedendo 5 anni di corso di cui i primi 3 dedicati alla pediatria generale (tronco comune) e i successivi 2 da dedicare alle attività elettive svolte in una sub-specialità pediatrica o nelle cure primarie o secondarie (3). Al momento del conseguimento del diploma, il giovane pediatra riceverà un *diploma supplement* in cui sono riportate le attività elettive, ma che non rappresenta il conseguimento del titolo di "pneumologo pediatra". Per ottenere qualcosa di analogo, il pediatra potrà conseguire un master di secondo livello in pneumologia pediatrica (che si tiene ogni anno presso l'Università Sapienza di Roma) e/o sottoporsi all'esame europeo proposto dall'*European Respiratory Society* (*European Examination in Paediatric Respiratory Medicine*) per ottenere il Diploma HERMES di specialista in pneumologia pediatrica (4).

Al di là del desiderio del singolo di diventare "pneumologo pediatra", l'insegnamento delle malattie respiratorie infantili riveste un ruolo fondamentale nella preparazione di tutti i pediatri.

Nonostante ciò, ad oggi non esiste un syllabus nazionale condiviso su questi temi e, di conseguenza, la formazione è attuata in maniera piuttosto disomogenea sul territorio nazionale.

Ma cosa avviene esattamente nelle scuole di specializzazione italiane?

Il Forum dei soci Junior (*under 40*) della Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili (SIMRI) ha provato a rispondere a questa domanda realizzando una *survey* destinata agli specializzandi in pediatria, in collaborazione con l'Osservatorio Nazionale Specializzandi in Pediatria (ONSP), l'associazione nazionale degli specializzandi in Pediatria.

MATERIALI E METODI

Abbiamo realizzato un questionario sulla piattaforma *Google Moduli*, compilabile in maniera anonima in circa 5-7 minuti. Le domande, volte ad indagare la percezione della qualità della formazione in ambito pneumologico pediatrico nella propria scuola, erano a scelta multipla o a risposta chiusa. La maggior parte degli *item* verteva sulla qualità e sulla frequenza delle attività formative, ma anche sulle attrezzature disponibili e sull'insegnamento di argomenti specifici. Laddove ritenuto utile, abbiamo chiesto ai medici in formazione specialistica di fornire un giudizio sulle attività formative svolte in strutture della rete formativa (al di fuori dalla sede centrale).

Per completare la *survey* era obbligatorio rispondere a tutte le domande.

La *survey* è rimasta online per 2 mesi (da maggio a luglio 2016, in modo da far sì che gli specializzandi del primo anno si fossero già fatti un'idea realistica della formazione nella propria scuola, dal momento che l'anno accademico italiano copre il periodo da luglio a giugno). Il link

alla *survey* è stato distribuito a tutti gli specializzandi in pediatria mediante le *mailing list* e le *newsletter* di ONSP, SIMRI e *Forum Junior Members* SIMRI.

Un *reminder* è stato inviato dopo 1 mese dall'inizio della *survey* e 2 settimane prima del suo termine. Per quanto riguarda l'analisi dei dati, le caratteristiche della popolazione studiata e delle attività formative sono state riassunte utilizzando una statistica descrittiva con medie e deviazioni *standard* o numeri assoluti e percentuali a seconda dei casi.

Ai giudizi degli specializzandi è stato attribuito un punteggio da 1 (molto scarso o non disponibile) a 5 (ottimo). La significatività delle differenze tra le medie dei campioni in esame è stata determinata per mezzo del test T di Student in caso di confronto tra due gruppi; la significatività delle differenze tra percentuali è stata determinata con il test del χ^2 (chi-quadrato) o, in caso di scarsa numerosità del campione, con il test delle probabilità esatte di Fisher.

La significatività statistica è stata stabilita come valore di $p < 0.05$.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEL CAMPIONE

Tab. 1 Caratteristiche del campione		
	N°	%
Età		
26-30 anni	120	65.9
31-35 anni	61	33.6
36-40 anni	1	0.5
Sesso		
Maschi	31	17.1
Femmine	151	82.9
Anno di conseguimento della laurea in medicina		
2001-2005		
2006-2010	2	1.1
2011-2015	53	29.1
	127	69.8
Anno di specializzazione		
1°		
2°	45	24.7
3°	33	18.1
4°	37	22.5
5°	37	20.3
	26	14.3

Hanno partecipato alla *survey* 182 specializzandi (151 femmine e 31 maschi) da 16 regioni italiane. La maggior parte di loro frequentava scuole di specializzazione site in Lombardia, in Emilia Romagna, nel Veneto e nel Lazio, per cui la percentuale di risposte è risultata maggiore nelle regioni del nord (48.9%) rispetto alle regioni del centro (24.7%) o del sud, isole comprese (26.4%) (tabelle 1 - 2).

Gli specializzandi erano distribuiti in maniera omogenea nei 5 anni di specializzazione (tabella 1). Il grado di interesse per la pneumologia pediatrica veniva giudicato elevato, moderato o scarso rispettivamente dal 35.2%, 54.4% e 10.4% dei partecipanti; nessuno ha riferito di non nutrire alcun interesse per la materia. Nonostante l'elevato grado di interesse per l'argomento, nessun partecipante ha definito "ottima" la propria preparazione in questo campo, mentre il 49.4% e il 47.8% l'ha definita rispettivamente "buona" e "mediocre" (2.2% "molto scarsa" e 0.6% "insufficiente"). Stratificando per anno di specializzazione le risposte a questo item ed assegnando a ciascuna risposta un voto da 1 (insufficiente) a 5 (ottima), abbiamo osservato che il punteggio medio tende a crescere dal primo anno (3.28) fino al terzo anno (3.68; $p = 0.0009$), per poi ridursi fino al quinto anno, nell'ambito del quale il 50% degli specializzandi ritiene la propria preparazione pneumologica "buona", mentre l'altro 50% la ritiene "mediocre". La differenza di punteggio tra primo e quinto anno, tuttavia, non è risultata significativa ($p = 0.118$).

QUALITÀ DELLA FORMAZIONE IN PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

Nell'ambito del corso di laurea in medicina e chirurgia la qualità della formazione teorica e della formazione pratica relative alle malattie respiratorie pediatriche è stata ritenuta inadeguata rispettivamente dal 65.4% e dall'86.8% dei partecipanti.

Nelle scuole di specializzazione la pneumologia pediatrica è insegnata mediante lezioni frontali, tirocini pratici, *journal club* e discussione di casi clinici. Chiedendo agli specializzandi di fornire un giudizio relativo alla frequenza e alla qualità di tali attività formative, abbiamo rilevato che il giudizio su lezioni frontali e tirocini pratici è per lo più "buono", mentre quello sui *journal club* è prevalentemente "insufficiente" (30.8%), laddove l'attività non sia addirittura "non disponibile" (19.2%).

Inoltre, lezioni frontali, tirocini pratici e discussione dei casi clinici non sono disponibili rispettivamente nel 7.1%, 5.5% e 9.9% dei casi (figura 1).

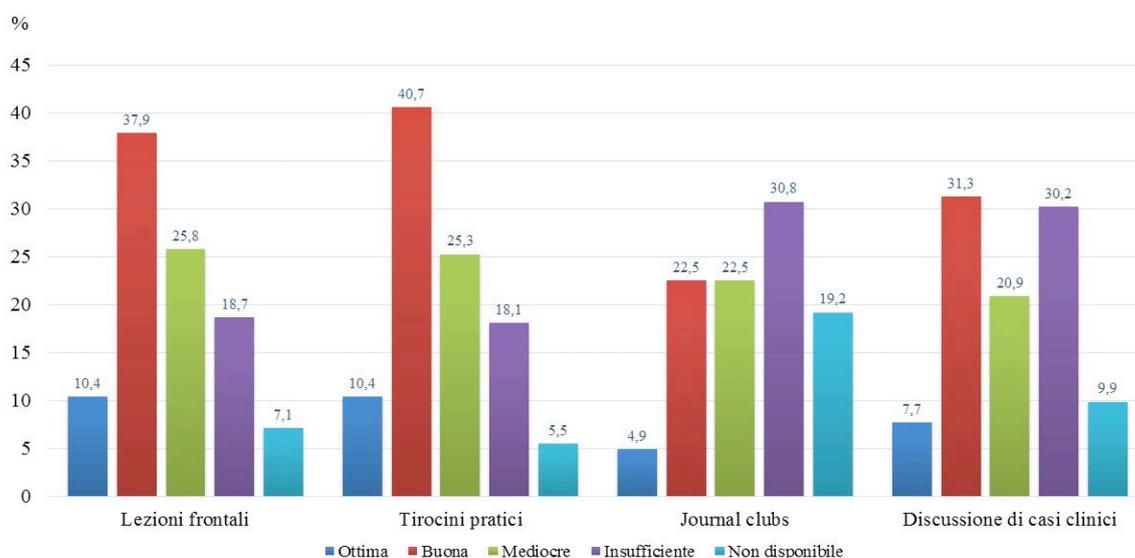


Fig.1: Giudizio sulla qualità e sulla frequenza delle attività formative di ambito pneumologico

Abbiamo ottenuto risultati analoghi analizzando le risposte dei soli specializzandi al quinto anno. Tuttavia, uno specialista in pneumologia pediatrica è presente nella scuola nell'83% dei casi.

Per quanto concerne la formazione relativa alla diagnostica per immagini del torace, la maggior parte degli specializzandi ritiene la formazione sulla radiografia del torace "buona" (40.7%), quella sulla tomografia computerizzata è per lo più ritenuta "scarsa" (33.5%) e quella sulla risonanza magnetica e sull'ecografia del torace sono ritenute insufficienti rispettivamente dal 39.6% e dal 34.1% dei partecipanti (figura 2).

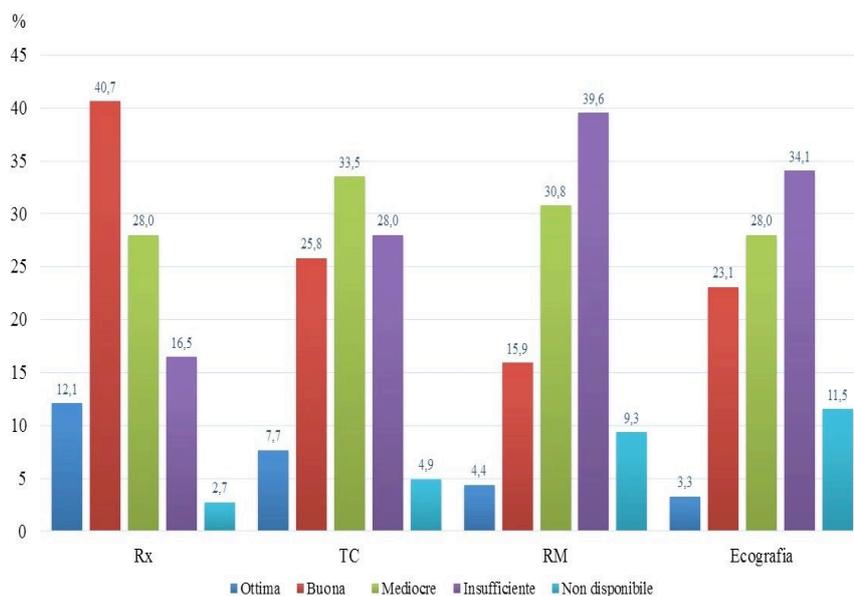


Fig. 2: Giudizio sulla qualità delle attività formative relative all'interpretazione dei principali esami di diagnostica per immagini del torace.

Relativamente all'insegnamento su specifici argomenti pneumologici, è emerso che in molti casi non vengono affrontati temi importanti quali radioprotezione in età pediatrica (85.2%), fisioterapia respiratoria e riabilitazione (71.4%) e cure palliative (67.6%) (figura 3).

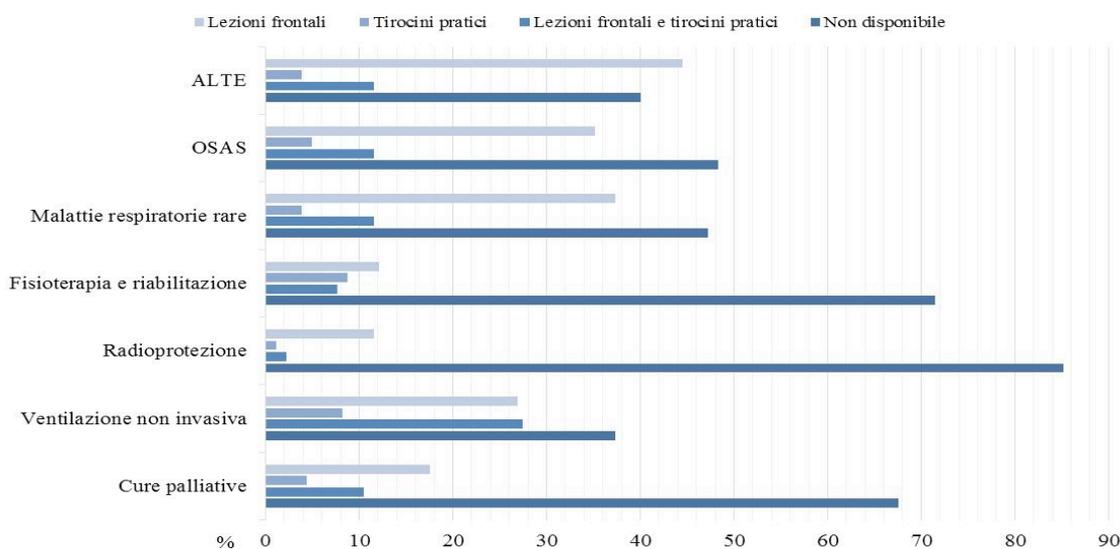


Fig. 3: Disponibilità di attività formative dedicate a particolari tematiche di ambito pneumologico

La possibilità di frequentare centri specialistici in Italia o all'estero risultava garantita nel 77.5% dei casi, mentre non lo era nel 13.7% dei casi; nei restanti 3.3% e 5.5% dei casi viene riferito che lo specializzando può recarsi esclusivamente in centri italiani oppure all'estero. Infine, il 51.6% degli specializzandi riferisce di non aver mai partecipato a congressi o convegni in ambito pneumologico pediatrico (al 1° anno, 71.1%; al 2°, 39.4%; al 3°, 54%; al 4°, 27%; al 5°, 50%).

TEST DIAGNOSTICI UTILIZZATI IN AMBITO PNEUMOLOGICO PEDIATRICO

Settantotto (97.8%), 171 (94%) e 143 (78.6%) specializzandi hanno dichiarato che nelle proprie

scuole sono disponibili rispettivamente uno spirometro, il test del sudore e la pH-metria delle 24 ore. L'analizzatore di ossido nitrico è presente nel 68.7% dei casi, la polisonnografia nel 65.9%, la broncoscopia nel 62.6%, il test di diffusione del monossido di carbonio nel 51.6% e la pletismografia corporea nel 44.5%.

Tuttavia, la formazione relativa all'impiego e all'interpretazione di questi test viene eseguita capillarmente solo per la spirometria (87.9%) ed il test del sudore (67%).

VALUTAZIONE COMPLESSIVA DEL PIANO FORMATIVO

Tutti i 182 partecipanti hanno dichiarato di ritenere importante la formazione in pneumologia pediatrica ed il 98.9% di essere a conoscenza del fatto che le malattie respiratorie pediatriche influenzano la salute respiratoria dell'adulto.

Rispetto al giudizio sull'importanza delle diverse attività formative per diventare un pneumologo pediatrico competente, l'84% degli specializzandi ha dichiarato di ritenere fondamentale la formazione teorica e pratica durante gli anni della specializzazione (figura 4).

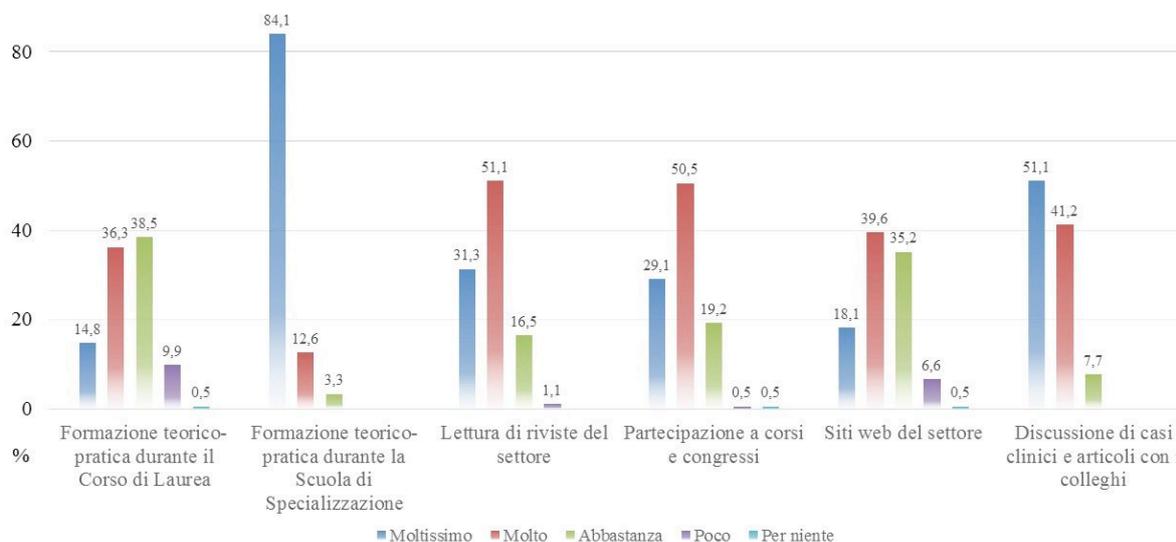


Fig. 4: Rilevanza di alcune attività formative per diventare un pneumologo pediatrico competente

Infine, abbiamo chiesto agli specializzandi un giudizio complessivo sul programma formativo in pneumologia della propria scuola. Solo il 7.7% ha riferito di esserne molto soddisfatto, mentre il 45.6% lo era abbastanza, il 40.1% non molto ed il 6.6% non lo era affatto. In quest'ultimo gruppo, 2 specializzandi erano al 1° anno, 3 al 2°, 2 al 3°, 3 al 4° e 2 al 5°. Risultati analoghi sono stati ottenuti analizzando le sole risposte degli specializzandi del quinto anno. A coloro che hanno risposto di non essere per nulla soddisfatti è stato chiesto cosa vorrebbero migliorare: tutti hanno suggerito che è necessario migliorare la qualità e la frequenza delle lezioni frontali e dei tirocini pratici.

DISCUSSIONE

La nostra è la prima indagine dedicata alla formazione in pneumologia pediatrica nelle scuole di specializzazione in pediatria nel nostro paese. Al momento dello svolgimento della *survey* gli specializzandi in pediatria erano circa 1800 e pertanto il nostro campione copre poco più del 10% degli interessati. Tuttavia, considerando che l'iniziativa è stata veicolata principalmente dalla SIMRI e dal suo *Forum Junior Members*, che oltre l'89% del campione definisce il proprio interesse per la pneumologia pediatrica elevato o moderato e che quasi il 100% del campione considera la materia importante, possiamo ritenere che i partecipanti all'indagine

rappresentino gli specializzandi più interessati all'argomento e, di conseguenza, anche quelli in grado di fornire un giudizio più critico e consapevole rispetto ai programmi formativi. Inoltre, non è stato possibile confrontare tra loro le risposte ottenute dalle tre macro-aeree del nostro paese a causa della disomogeneità nelle percentuali di partecipanti; sfortunatamente, abbiamo anche registrato una scarsissima partecipazione (tabella 2).

Tab. 2 Distribuzione regionale dei partecipanti

Legenda: Verde: Nord; Verde chiaro: Centro; Giallo: Sud e Isole. In bianco sono indicate la Valle d'Aosta, la Basilicata, il Molise e il Trentino-Alto Adige, che non hanno sul proprio territorio alcuna scuola di specializzazione in pediatria.

	n.	%	
Lombardia	31	17.0	
Emilia - Romagna	24	13.2	
Veneto	24	13.2	
Lazio	23	12.6	
Toscana	18	9.9	
Campania	16	8.8	
Abruzzo	12	6.6	
Liguria	8	4.4	
Sicilia	8	4.4	
Sardegna	6	3.3	
Calabria	3	1.6	
Puglia	3	1.6	
Marche	3	1.6	
Friuli – Venezia Giulia	1	0.6	
Piemonte	1	0.6	
Umbria	1	0.6	

Nonostante i limiti suddetti, i risultati dell'indagine hanno messo in evidenza come, nonostante l'importanza della materia, i programmi formativi delle diverse Scuole di Specializzazione siano molto disomogenei. Di conseguenza, la percezione del livello di preparazione pneumologica degli specializzandi non è ottimale, in particolare alla fine del percorso formativo, con metà degli specializzandi del quinto anno a definire la propria preparazione buona e l'altra metà a definirla mediocre. Il problema formativo relativo alle malattie respiratorie infantili emerge in realtà già durante gli anni del corso di Laurea: infatti, a questo proposito, più del 60% dei partecipanti ritiene inadeguata la formazione teorica e più dell'85% ritiene inadeguata quella pratica. Tale dato appare particolarmente preoccupante dal momento che la maggior parte dei neolaureati non si dedicherà a un percorso esclusivamente pediatrico, ma si troverà sicuramente a gestire sul territorio o in ospedale anche pazienti in età pediatrica.

Dall'indagine è emerso che nelle scuole di specializzazione la formazione avviene prevalentemente mediante lezioni frontali e tirocini pratici, giudicati per lo più positivamente, mentre modalità di apprendimento più moderne e interattive come *journal club* e discussione dei casi clinici vengono eseguite adeguatamente e frequentemente solo in alcune realtà. Inoltre, la qualità della formazione su temi specifici, come ad esempio l'esecuzione e l'interpretazione degli esami di diagnostica per immagini, è risultata accettabile esclusivamente per la radiografia del torace, mentre emerge chiaramente una carenza formativa rispetto a tomografia computerizzata, risonanza magnetica ed ecografia del torace. Allo stesso modo, una grave carenza formativa interessa ambiti di estremo interesse e attualità, quali la radioprotezione in età pediatrica, la fisioterapia respiratoria e le cure palliative. In questo contesto si rileva, però, una nota positiva: le scuole di specializzazione sono fornite delle più comuni strumentazioni

e dei principali test diagnostici nel campo delle malattie respiratorie. Tuttavia, la formazione su indicazioni, esecuzione ed interpretazione dei diversi test è piuttosto carente e soltanto la spirometria viene insegnata capillarmente (87.9% dei casi).

Ciò stride con la diffusa presenza nelle scuole di almeno un pneumologo pediatra (83% dei casi). Ne possiamo dedurre che questi specialisti vengono forse coinvolti poco nel percorso formativo degli specializzandi per il loro mancato inquadramento nel personale docente o perché troppo impegnati nell'attività assistenziale e/o di ricerca o per l'inadeguatezza dei programmi. Allo stesso tempo, in qualche caso la formazione relativa ai test diagnostici appare limitata perché in alcune scuole i mesi dedicati alla "rotazione" in pneumologia sono appena 2 nel corso dei 3 anni del tronco comune, favorendo la formazione degli specializzandi che scelgono di dedicare gli ultimi due anni a questa branca. Ad ogni modo, per gli specializzandi particolarmente interessati alla pneumologia pediatrica nella maggior parte dei casi risulta possibile recarsi all'estero o in centri specialistici italiani per approfondire l'argomento per un periodo di tempo limitato; si segnala, tuttavia, un 13.7% di casi in cui tale opportunità non viene concessa.

Sorprende, inoltre, il fatto che solo 1 specializzando su 2 abbia partecipato a corsi o convegni in ambito pneumologico pediatrico. Ciò implica che i medici in formazione specialistica non hanno la possibilità di confrontarsi con colleghi e specialisti di altre realtà, né di apportare un proprio contributo fattivo alla ricerca e allo studio delle malattie respiratorie. Se da un lato non è trascurabile il fatto che gli specializzandi tendano naturalmente a preferire congressi pediatrici di respiro più "generalista" per approfondire la propria formazione pediatrica a 360 gradi, dall'altro dovrebbe essere favorita e incentivata la loro partecipazione ad eventi congressuali relativi alle subspecialità. Infine, abbiamo chiesto agli specializzandi se fossero o meno entusiasti del piano formativo in pneumologia della propria scuola.

Solo il 7.7% afferma di essere entusiasta, mentre il 45.6% lo è "abbastanza" ed il restante 53.3% non lo è affatto. Questo dato fa particolarmente riflettere considerando che l'84% del campione ritiene fondamentali proprio gli anni della formazione nelle scuole di specializzazione per diventare pneumologi pediatri competenti. È anche da notare come tutti gli specializzandi che hanno dichiarato di non essere per nulla soddisfatti abbiano indicato la necessità di migliorare le lezioni frontali ed i tirocini. Il nostro studio, quindi, ha messo in evidenza lacune formative che necessitano di essere colmate. Innanzitutto, è necessario che vengano rivisti i programmi formativi dell'insegnamento di pediatria nei corsi di laurea, in modo da fornire ai futuri medici un livello di conoscenza di base sufficiente per poter riconoscere e gestire sul campo almeno le patologie respiratorie infantili più comuni. Per quanto riguarda le scuole di specializzazione, oltre al richiamo a un maggior coinvolgimento dei pneumologi pediatri nella formazione e degli specializzandi agli eventi scientifici, a nostro parere è necessario prima di tutto rivedere e riorganizzare il *syllabus* formativo, che deve essere aggiornato per includere nuovi test diagnostici ed argomenti emergenti ed attuali. Il tema della disomogeneità della formazione nelle scuole di specializzazione, così come quello del mancato riconoscimento delle subspecialità pediatriche, è un annoso problema presente anche in altri Paesi dell'Unione Europea (5). Per far fronte alla pleora di comportamenti formativi diversi a livello nazionale e comunitario e con l'obiettivo di tentare un'armonizzazione della formazione in Europa, nel 2002 l'ERS (European Respiratory Society) ha realizzato in collaborazione con l'UEMS un primo *syllabus* europeo per la formazione in pneumologia pediatrica (6). Nel 2007 è stata istituita una vera e propria *Task Force* dell'ERS su questo tema (*Pediatric HERMES - Harmonized Education in Respiratory Medicine for European Specialists*), che ha realizzato un aggiornamento del *syllabus* comprensivo di 21 moduli obbligatori e 3 moduli opzionali e con i livelli apprendimento attesi per ciascuna tematica (7-8). Dal 2011, ogni anno, durante il congresso internazionale dell'ERS, è possibile sostenere l'esame di diploma sulla base di questo *syllabus* (4). In tal modo si può ottenere il titolo europeo di pneumologo pediatra ed entrare nel registro europeo dei diplomati.

Dal momento che il *syllabus* dell'ERS, aggiornato e validato, è già disponibile e sempre più diffuso in Europa, è auspicabile che le società scientifiche si facciano carico del compito di por-

tarlo all'attenzione delle autorità accademiche affinché venga adottato in tutti i paesi dell'Unione Europea. Il passo successivo sarà rappresentato dalla stesura di criteri condivisi per riconoscere ed accreditare le scuole in grado di formare adeguatamente i futuri sub-specialisti in pneumologia pediatrica.

CONCLUSIONI

La formazione sulle malattie respiratorie pediatriche riveste un ruolo di particolare importanza per la formazione dei medici in generale e dei pediatri in particolare.

La nostra indagine ha messo in evidenza una certa disomogeneità di comportamenti e diverse lacune formative rispetto a questo tema nel sistema formativo dei corsi di laurea in medicina e delle scuole di specializzazione in pediatria. Per rimediare è necessario, innanzitutto, aggiornare il *syllabus* formativo, eventualmente adottando quello realizzato dall'ERS, che è già riconosciuto a livello europeo.

RINGRAZIAMENTI

Desideriamo ringraziare la SIMRI e l'ONSP per il prezioso supporto fornito per la realizzazione di questa indagine. Ringraziamo anche i membri del *Forum Junior Members* della SIMRI, che hanno contribuito a diffondere l'iniziativa e a coinvolgere gli specializzandi in pediatria. Infine, vorremmo ringraziare tutti gli specializzandi che hanno partecipato all'indagine: riteniamo che il loro contributo possa rappresentare un primo passo verso un processo di riorganizzazione e miglioramento della formazione in pneumologia pediatrica in Italia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) de Martino M, Ballotti S. *The child with recurrent respiratory infections: normal or not?* *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: S13-18.
- (2) European Union of Medical Specialists (UESM). *Training Requirements for the Specialty of Paediatrics*. www.uems.eu
- (3) Pettoello-Mantovani M et al. *Diversity and differences of postgraduate training in general and subspecialty pediatrics in the European Union*. *Pediatr* 2014; 165: 424-426.
- (4) European Respiratory Society (ERS). *HERMES European Examination in Paediatric Respiratory Medicine*. <http://hermes.ersnet.org/exams/european-examination-in-paediatric-respiratory-medicine.html>.
- (5) Ehrich JH, Kerbl R, Pettoello-Mantovani M, et al. *Opening the Debate on Pediatric Subspecialties and Specialist Centers: Opportunities for Better Care or Risks of Care Fragmentation?* *J Pediatr* 2015; 167: 1177-1178.
- (6) Zach MS. Long Range Planning Committee, Paediatric Assembly of the European Respiratory Society, Committee on Paediatric Respiratory Training in Europe, European Board of Paediatrics. *Paediatric respiratory training in Europe: syllabus and centres*. *Eur Respir J* 2002; 20: 1587-1593.
- (7) Gappa M, Noel J-L, Severin T, et al. *Paediatric HERMES: a European Syllabus in Paediatric Respiratory Medicine*. *Breathe* 2009; 5: 236-247.
- (8) Gappa M, Paton J, Baraldi E. *Paediatric HERMES: update of the European Training Syllabus for Paediatric Respiratory Medicine*. *Eur Respir J* 2009; 33: 464-465.

Articoli dal prossimo numero

Forthcoming articles

**PNEUMOLOGIA PEDIATRICA DICEMBRE 2018
XII CONGRESSO SIMRI**

Conferenze e meeting

Conferences and meetings

Ottobre 2018

TERZO CONGRESSO NAPOLI PEDIATRIA 2018. CONFRONTO TRA SPECIALITÀ MEDICHE E CHIRURGICHE

Napoli, 4 ottobre 2018

Segreteria Organizzativa: MGM Congress, Napoli
Tel: 081.5454285 Fax: 081.5465507
Mail: info@mgmcongress.org

VACCINARE: DAL CONCEPIMENTO ALL'ETÀ ADULTA

Varese 20 ottobre 2018

Segreteria Organizzativa iDea congress, Roma
Tel: 06 36381573 – Fax: 06 36307682
Mail: info@ideacpa.com

PROVE DI FUNZIONALITÀ RESPIRATORIA IN ETÀ PEDIATRICA. OLTRE LA SPIROMETRIA

Napoli, 26-27 ottobre 2018

Segreteria Organizzativa: Center Comunicazione e
Congressi, Napoli
Tel: 081 19578490 – Fax: 081 19578071
Mail: info@centercongressi.com

Novembre 2018

LA VENTILAZIONE A LUNGO TERMINE IN ETÀ PEDIATRICA

Roma, 8- 10 novembre 2018

Segreteria Organizzativa: Center Comunicazione e
Congressi, Napoli
Tel: 081 19578490 – Fax: 081 19578071
Mail: info@centercongressi.com

NOI SIAMO QUELLO CHE MANGIAMO III EDIZIONE

Chieti, 16-17 novembre 2018

Segreteria Organizzativa: Center Comunicazione e
Congressi, Napoli
Tel: 081 19578490 – Fax: 081 19578071
Mail: info@centercongressi.com

PERCORSO INTERATTIVO DI BRONCOPNEUMOLOGIA PEDIATRICA

Chieti, 23-24 novembre 2018

Segreteria Organizzativa: Center Comunicazione e
Congressi, Napoli
Tel: 081 19578490 – Fax: 081 19578071
Mail: info@centercongressi.com

ATAXIA TELANGIECTASIA CLINICAL RESEARCH CONFERENCE

Napoli 29 novembre 1 dicembre 2018

Segreteria Organizzativa: Center Comunicazione e
Congressi, Napoli
Tel: 081 19578490 – Fax: 081 19578071
Mail: info@centercongressi.com

Dicembre 2018

INCONTRI DI PEDIATRIA A MILANO

Milano, 1 dicembre 2018

Segreteria Organizzativa iDea congress, Roma
Tel: 06 36381573 – Fax: 06 36307682
Mail: info@ideacpa.com

THESIS 2018: PERCORSI INTERATTIVI E FORMATIVI PEDIATRICI

Napoli 14 - 15 Dicembre 2018

Segreteria Organizzativa iDea congress, Roma
Tel: 06 36381573 – Fax: 06 36307682
Mail: info@ideacpa.com

