



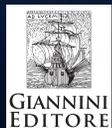
# PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

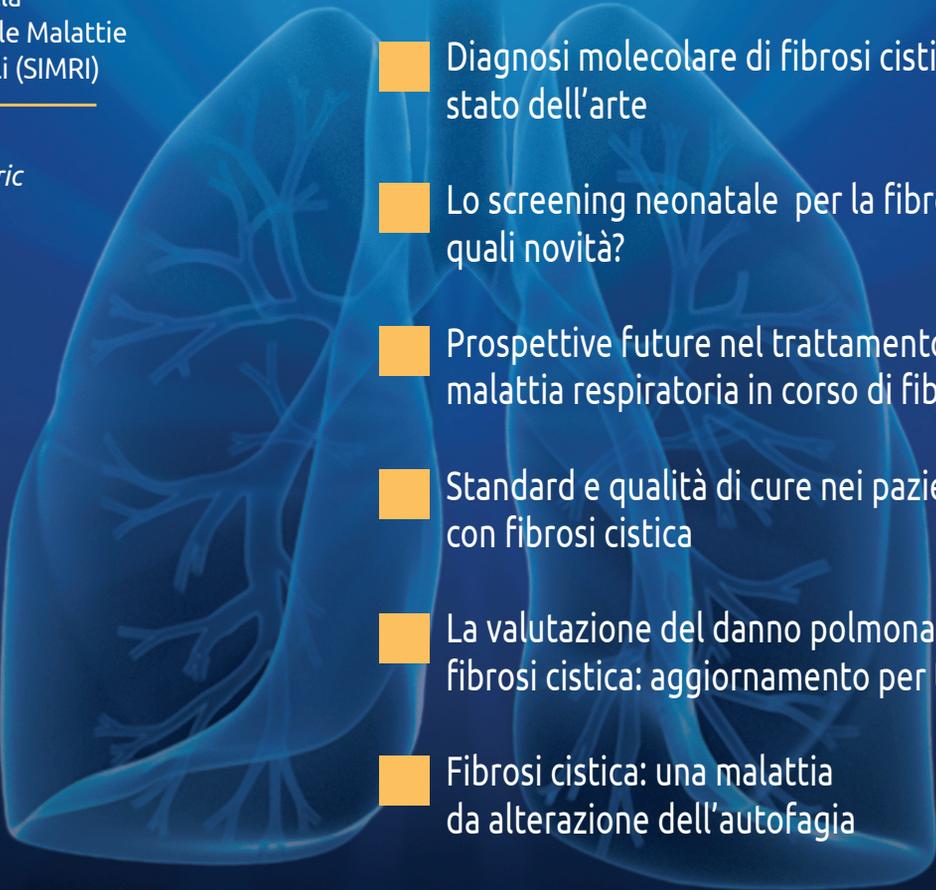
## LA FIBROSI CISTICA

Organo ufficiale della  
Società Italiana per le Malattie  
Respiratorie Infantili (SIMRI)

*Official Journal  
of the Italian Pediatric  
Respiratory Society*

Volume 15 / n. 57  
Rivista trimestrale  
Spedizione in A.P.  
art.2 comma 20/b  
legge 662/96 Pisa  
Reg. Trib. PI n.12  
del 3 giugno 2002



- 
- Diagnosi molecolare di fibrosi cistica: stato dell'arte
  - Lo screening neonatale per la fibrosi cistica: quali novità?
  - Prospettive future nel trattamento medico della malattia respiratoria in corso di fibrosi cistica
  - Standard e qualità di cure nei pazienti con fibrosi cistica
  - La valutazione del danno polmonare nella fibrosi cistica: aggiornamento per tutte le età
  - Fibrosi cistica: una malattia da alterazione dell'autofagia

# INDICE

## Editoriale

### *View point*

Francesca Santamaria

5

## Diagnosi molecolare di fibrosi cistica: stato dell'arte

### *Molecular diagnosis of cystic fibrosis: state of the art*

Paola Nardiello, Giuseppe Castaldo

6

## Lo screening neonatale per la fibrosi cistica: quali novità?

### *Newborn screening for cystic fibrosis: what news?*

Valeria Raia, Angela Sepe, Fabiola De Gregorio e Antonella Tosco

12

## Prospettive future nel trattamento medico della malattia respiratoria in fibrosi cistica

### *Therapy for cystic fibrosis lung disease: current status and future perspectives*

Valeria Galici, Cesare Braggion

17

## Standard e qualità di cure nei pazienti con fibrosi cistica

### *Standards and quality of care in cystic fibrosis*

Elisabetta Bignamini

24

## Valutazione del danno polmonare nella fibrosi cistica: aggiornamento per tutte le età

### *Assessment of pulmonary impairment in cystic fibrosis from childhood to young adults*

Giovanna Pisi, Valentina Fainardi

29

## Fibrosi cistica: una malattia da alterazione dell'autofagia

### *Cystic fibrosis: a disease with defective autophagy*

Luigi Maiuri, Daniela De Stefano

35

## “Aria buona a scuola”: un'indagine pilota in Campania

### *“Good air at school”: a pilot study in Campania*

Silvia Montella, Angela Orabona, Laida Lisa di Micco e Francesca Santamaria

41

# Pneumologia Pediatria

Volume 15, n. 57 - Marzo 2015

Reg. Trib. PI n. 12 del 3 giugno 2002

## Direttore Responsabile

Francesca Santamaria (Napoli)

## Direzione Scientifica

Stefania La Grutta (Palermo)

Luigi Terracciano (Milano)

## Segreteria Scientifica

Silvia Montella (Napoli)

## Comitato Editoriale

Angelo Barbato (Padova)

Filippo Bernardi (Bologna)

Alfredo Boccaccino (Misurina)

Attilio L. Boner (Verona)

Mario Canciani (Udine)

Carlo Capristo (Napoli)

Fabio Cardinale (Bari)

Salvatore Cazzato (Bologna)

Renato Cutrera (Roma)

Fernando M. de Benedictis (Ancona)

Fulvio Esposito (Napoli)

Mario La Rosa (Catania)

Massimo Landi (Torino)

Gianluigi Marseglia (Pavia)

Fabio Midulla (Roma)

Luigi Nespoli (Varese)

Giorgio L. Piacentini (Verona)

Giovanni A. Rossi (Genova)

Giancarlo Tancredi (Roma)

Marcello Verini (Chieti)

## Editore

Giannini Editore

Via Cisterna dell'Olio 6b

80134 Napoli

e-mail: editore@gianninispia.it

www.giannineditore.it

## Coordinamento Editoriale

Center Comunicazioni e Congressi Srl

e-mail: info@centercongressi.com

Napoli

## Realizzazione Editoriale e Stampa

Officine Grafiche F. Giannini & Figli SpA

Napoli

© Copyright 2015 by SIMRI

Finito di stampare nel mese di marzo 2015

## 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; le parole chiave, invece, in italiano e in inglese (la somma delle battute, spazi inclusi, non deve superare i 1.700 caratteri, 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 disdascalie 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 hypohydrated 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) Krmpotic-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 inviata gratuitamente a tutti i soci della Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili; i prezzi di abbonamento annuo per i non soci sono i seguenti:

Italia ed Estero: € 72,00; singolo fascicolo: € 20,00.

# Lettera del Presidente

---

Cari Colleghi

A cinque mesi dalla mia entrata in funzione come Presidente della Società sento il bisogno di dare comunicazione di quanto fatto finora e dei prossimi impegni del Direttivo.

Innanzitutto il passaggio della segreteria amministrativa alla Center Congressi, con un contratto triennale rinnovabile annualmente, ha permesso di effettuare una programmazione di più ampio respiro. Come avrete saputo il prossimo congresso nazionale si svolgerà a Torino dal 22 al 24 ottobre 2015 con il grande aiuto di Elisabetta Bignamini e Massimo Landi. Il congresso 2016 si svolgerà a Roma nel mese di Ottobre.

Sono state assegnate delle deleghe ai membri del Direttivo e a Soci impegnati in cariche di prestigio in società scientifiche ed europee. L'elenco delle deleghe è disponibile sul sito web della [SIMRI](#).

Il sito è stato aggiornato con la possibilità di pagare le quote sociali con bonifico bancario, conto corrente postale e con carta di credito, accedendo all'area riservata del sito con la propria username e password. Il nuovo sito con veste grafica differente e contenuti rinnovati sarà disponibile a breve.

La rivista Pneumologia Pediatrica (<http://simri.it/simri/referer/100/idPage/225/lang/it/Rivista-Pneumologia-pediatria.html>) diretta da Francesca Santamaria con l'aiuto dei co-direttori Stefania La Grutta e Luigi Terracciano è disponibile da questo numero solo in formato on line per tutti soci. La rivista ha sinergie con il sito web, il cui comitato editoriale è stato rinnovato e rinforzato.

Inutile dire che tali attività sono aperte a tutti i soci di buona volontà e pertanto contributi possono essere inviati ai direttori della rivista e del sito web.

Una newsletter sarà inviata a tutti soci periodicamente con notizie sulla vita della Società e con novità culturali prese dalla letteratura scientifica.

È stato selezionato un nuovo Ufficio Stampa, Intermedia, che renderà visibile le notizie riguardanti la vita della Società al pubblico non di settore.

Abbiamo siglato degli accordi quadro per cooperazioni con la Società Italiana di Pediatria (Federazione delle Società di Area Pediatrica) e con società Allergologiche e Pneumologiche dell'adulto SIAAIC, SIMER, AICNA, APA, North East Allergy, Network nell'ambito di INAIA (Italian Network in Allergy, Immunology & Asthma). Inoltre è stato deliberato un protocollo di intesa con [l'Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri \(AIPO\)](#) al fine di favorire una reciproca crescita culturale nei campi di interesse e una maggiore rappresentatività della Pneumologia Pediatrica nei tavoli regionali di pertinenza respiratoria. L'accordo con AIPO renderà possibile a tutti i soci interessati la possibilità di iscrizione congiunta ad AIPO ed ERS a costi estremamente contenuti.

Sono in corso contatti con ERS al fine di permettere una visibilità della SIMRI a livello europeo.

Una delegazione SIMRI con molti giovani sarà presente al [Congresso Internazionale ATS a Denver](#) da 15 al 20 Maggio p.v. Nell'ambito del congresso, grazie all'aiuto di Enrico Lombardi, nostro rappresentante presso l'ATS, si svolgerà un joint meeting della nostra delegazione con la Pediatric Assembly dell'ATS. Speriamo che questo incontro sia l'inizio di una serie di proficue collaborazioni, soprattutto per i giovani soci.

Sempre per i giovani sono state bandite fellowship per favorirne la partecipazione al [Congresso Nazionale SIMRI](#), al [Congresso Nazionale ERS Amsterdam 26-20 Settembre](#) e al [Corso di preparazione all'esame Hermes pediatrico Barcellona 17-19 Giugno](#).

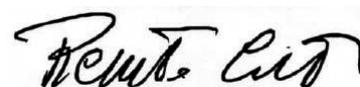
[I relativi bandi sono disponibili sul sito della SIMRI.](#)

La dott.ssa Elisabetta Bignamini sta lavorando molto insieme a un gruppo di soci per realizzare un database SIMRI che possa raggruppare i database esistenti (Asma grave e Discinesia Ciliare Primitiva) con quelli in corso di realizzazione su altri gruppi di patologie rare (Malformazioni respiratorie, Interstiziopatie polmonari, Insufficienza respiratoria cronica, Pneumopatie croniche post infettive). Vi terremo informati sullo stato di attivazione e tutti soci che ritengono di poter collaborare saranno benvenuti.

Sono inoltre in fase avanzata di realizzazione altri progetti, sui quali vi terremo informati attraverso la newsletter per i soci.

Ringrazio tutto il Direttivo che sta sostenendo con entusiasmo e disponibilità questo impegno di rinnovamento della SIMRI, rispettoso della storia della Società e di quanti nel tempo si sono impegnati per essa.

Aspettando i vostri commenti e le vostre critiche costruttive. “Uniti per migliorare”



## Editoriale

---

La fibrosi cistica (FC) è la più diffusa patologia su base ereditaria responsabile di broncopneumopatia cronica nella razza Caucasica. Grazie alla aumentata disponibilità sul territorio di centri specialistici di riferimento ed al miglioramento delle cure, la sopravvivenza dei bambini ed adolescenti affetti è significativamente migliorata e sempre più numerosi sono gli adulti attualmente seguiti. Vista l'importanza della patologia, abbiamo deciso di dedicare il 1<sup>o</sup> numero dell'anno della nostra rivista alle novità in tema di FC.

I genetisti del CEINGE di Napoli ci aggiorneranno sulle novità della diagnosi molecolare di FC che, come molti sanno, è indispensabile in diversi casi, soprattutto se a presentazione clinica atipica. Realizzare lo screening neonatale, da sempre è stato considerato utile per la conoscenza della storia naturale della malattia, e il gruppo di Valeria Raia ci chiarirà se diagnosticare presto la FC è anche utile per migliorare la prognosi del singolo individuo. Poiché nella FC l'interessamento polmonare influenza fortemente il decorso clinico della malattia, abbiamo chiesto agli esperti di Parma un aggiornamento sulle modalità più corrette di diagnosi di malattia polmonare a tutte le età. Se ci sono nuove prospettive nel trattamento medico della malattia respiratoria e se la qualità di cure offerte in Italia ed in Europa ai pazienti affetti sono davvero cambiate negli ultimi anni, ce lo diranno gli esperti FC di Firenze e di Torino.

Infine, il manoscritto di Luigi Maiuri ci metterà al corrente sui recenti progressi della ricerca di base che, ci auguriamo, potranno aiutare i clinici ad identificare nuove strategie terapeutiche utili ai pazienti.

In aggiunta agli interessanti aggiornamenti sulla fibrosi cistica, un piccolo report su un'indagine "pilota" condotta dal Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali dell'Università Federico II di Napoli in collaborazione con l'Ufficio Scolastico Regionale della Campania e finalizzata a informare e sensibilizzare il personale docente e gli operatori scolastici sulle cause delle malattie allergico-respiratorie e sulle misure di prevenzione ad esse legate.

Buona lettura!

Francesca Santamaria  
e-mail: santamar@unina.it

---

Paola Nardiello, Giuseppe Castaldo  
*CEINGE-Biotecnologie avanzate,  
Napoli. Dipartimento di Medicina  
Molecolare e Biotecnologie Mediche,  
Università di Napoli Federico II*

**Corrispondenza:** Giuseppe Castaldo  
**email:** giuseppe.castaldo@unina.it

## Diagnosi molecolare di Fibrosi Cistica: stato dell'arte

*Molecular diagnosis of Cystic Fibrosis: state of the art*

**Riassunto** La Fibrosi Cistica (FC) è la più frequente malattia autosomica recessiva letale nei caucasici anche se la diagnosi precoce (*screening* neonatale) ne ha migliorato l'*outcome*. Inoltre, sono note forme di FC a prognosi favorevole (*CFTR-Related Disorders*), che si manifestano con pancreatiti ricorrenti, agenesia bilaterale dei dotti deferenti, bronchiectasie, etc. La diagnosi molecolare contribuisce alla conferma di malattia, alla previsione dell'*outcome* (correlazione genotipo-fenotipo) e, poiché sono disponibili farmaci in grado di correggere il difetto causato da specifiche mutazioni, alla guida alla terapia. Inoltre, contribuisce ad identificare le coppie a rischio di generare un figlio affetto attraverso lo *screening* a cascata o lo *screening* di massa del portatore. Infine, alle coppie a rischio può essere offerta la diagnosi prenatale (su DNA da villi coriali o, in casi selezionati, su DNA fetale da sangue materno) o preimpianto nelle coppie che ricorrono alla procreazione assistita. Ad oggi sono note 2000 mutazioni del gene responsabili di malattia e le linee guida suggeriscono di effettuare un I livello di analisi (ricerca delle mutazioni più diffuse, che ha una ridotta sensibilità diagnostica) e poi il sequenziamento del gene nei casi negativi, che può però identificare mutazioni nuove, per le quali è difficile stabilire il carattere patogenetico senza ricorrere a studi *in vitro*. In ogni caso, anche dopo il sequenziamento, circa il 5% degli alleli FC non presenta mutazioni. Negli ultimi anni è emerso il ruolo delle aree non codificanti del gene (promotore, introni, etc.), che potrebbero ospitare mutazioni causative, ma lo studio di queste regioni è limitato ai laboratori di ricerca.

**Parole chiave:** Fibrosi Cistica, gene, mutazioni, diagnosi molecolare

**Key words:** Cystic Fibrosis, gene, mutations, molecular diagnosis

### INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia genetica ereditaria autosomica recessiva, cronica, evolutiva, che colpisce con uguale frequenza maschi e femmine. È la malattia genetica grave più diffusa nella popolazione caucasica, con un'incidenza di circa 1 neonato malato ogni 2500; in Italia i pazienti stimati sono circa 5.000 (1). Attualmente la sopravvivenza media è di circa 40 anni (2). La malattia (forma classica) è caratterizzata dalla presenza di secrezioni dense che causano malattia polmonare cronica ostruttiva con evoluzione verso l'insufficienza respiratoria; nell'ambito di una grande variabilità interindividuale si possono avere altre manifestazioni cliniche, tra cui insufficienza pancreatica, epatopatia, diabete e, nella quasi totalità dei maschi affetti, azoospermia da agenesia bilaterale congenita dei vasi deferenti (CBAVD). Le modalità di comparsa, la severità ed il decorso della malattia sono variabili. Alcuni pazienti presentano precocemente i sintomi polmonari della malattia (infezioni respiratorie ricorrenti) e manifestazioni gastrointestinali quali ileo da meconio alla nascita e malassorbimento da insufficienza pancreatica; altri hanno sintomi respiratori modesti fino all'adolescenza, con un quadro digestivo normale (3, 4). La discordanza dell'espressione clinica della FC a livello polmonare, epatico

e gastrointestinale è presente anche in pazienti con lo stesso genotipo *CFTR* o addirittura in coppie di fratelli affetti dalla malattia. Ciò ha spinto alla ricerca di geni, ereditati indipendentemente da *CFTR*, che agiscano da modulatori dell'espressione clinica della malattia (5). Oltre alla forma classica di FC esistono forme a fenotipo attenuato caratterizzate da modesta espressione clinica respiratoria e normale funzione pancreatica, spesso identificate in pazienti adulti (coinvolgendo quindi andrologi, gastroenterologi, pneumologi, etc.); in genere la malattia interessa un unico organo, come i dotti deferenti con la CBAVD che causa infertilità nei maschi oppure il pancreas con episodi di pancreatite ricorrente. Le forme monosintomatiche sono state per lungo tempo definite forme atipiche di FC, mentre oggi si parla di *CFTR-Related Disorders (CFTR-RD)* per indicare le forme cliniche che non soddisfano i criteri per la diagnosi di FC (6). L'evoluzione clinica di tali forme è poco nota, ma la prognosi appare più favorevole rispetto alla forma classica (3).

### DIAGNOSI

Per la diagnosi di FC è necessaria la presenza di sintomi tipici o di familiarità (fratelli ammalati) o test di *screening* neonatale patologico, che devono essere associati a test del sudore positivo

o ad identificazione di due mutazioni del gene *CFTR* in trans o ad alterazioni della differenza di potenziale nasale (Tabella 1) (7).

**Tab. 1. Criteri diagnostici per FC**

Sintomatologia clinica tipica (incluso l'ileo da meconio) Anamnesi familiare positiva (presenza di fratelli affetti) Screening neonatale positivo (IRT elevato)
+
Test del sudore alterato Alterato trasporto ionico a livello dell'epitelio nasale e rettale Analisi genetica positiva (presenza di una mutazione patogenetica su entrambi gli alleli)

Nelle forme *CFTR-RD* con test del sudore negativo o *borderline*, l'analisi molecolare diventa l'unico strumento di aiuto al clinico nella definizione diagnostica (8), anche se a volte sono identificate varianti nuove o di incerto significato patogenetico (9).

### SCREENING NEONATALE (NBS)

La diagnosi di FC per sintomi è sempre più rara; infatti, oggi la maggior parte dei soggetti affetti è identificata attraverso lo *screening* neonatale. La FC, infatti, soddisfa pienamente i criteri di applicazione di un programma di *screening* neonatale, in quanto è una malattia cronica evolutiva con un'elevata incidenza le cui manifestazioni cliniche insorgono precocemente nell'infanzia; vi è ormai comune accordo che lo *screening* neonatale della FC è in grado di ridurre la severità della malattia, con riduzione dei costi per l'assistenza. I risultati di numerosi studi condotti a livello internazionale in termini d'impatto clinico ed epidemiologico hanno stabilito che la diagnosi neonatale di FC, se associata ad un trattamento precoce, riduce il rischio di danno polmonare nell'infanzia, migliora la qualità di vita e in definitiva migliora la sopravvivenza; ha inoltre un effetto benefico sullo stato nutrizionale, con il miglioramento della crescita, e può prevenire la malnutrizione da carenza di vitamine liposolubili e di proteine. Infine, la diagnosi neonatale della malattia migliora la reazione psicologica dei genitori, che subiscono uno stress inferiore rispetto a quello che riceverebbero in caso di diagnosi più tardiva, quando siano già comparsi i sintomi clinici caratteristici (10). Esistono molti protocolli diversi in Europa per lo *screening* neonatale di FC; tutti si basano attualmente sul dosaggio del tripsinogeno immunoreattivo (IRT) in terza giornata, come prima analisi, e sul test del sudore come analisi conclusiva, che nella maggioranza dei casi conferma o esclude la diagnosi di FC. Tra questi, si collocano test intermedi, variabili tra i vari protocolli ed utilizzati in varie combinazioni; infatti, i casi di neonati con IRT positivo sono una minoranza (circa 1-2%) della popolazione totale screenata e rappresentano una fascia di popolazione a più alto rischio di FC. Poiché l'IRT risulta elevato, nei primi mesi di vita, negli

affetti da FC ma anche in alcuni neonati sani, al fine di migliorare la specificità dello *screening* alcuni dei programmi prevedono che i neonati con IRT elevato siano sottoposti ad analisi delle mutazioni più frequenti, che in alcuni programmi è preceduta da un secondo prelievo su spot di Guthrie per esecuzione di un II dosaggio di IRT (il secondo spot di Guthrie è prelevato intorno alla ventesima giornata di vita). La presenza di due mutazioni consente di porre diagnosi di malattia, mentre qualora se ne individui una sola il test del sudore discriminerà tra semplici portatori ed affetti con una sola mutazione identificabile. Infine, alcuni programmi prevedono, per i neonati risultati portatori di una sola mutazione dopo analisi delle mutazioni più frequenti, l'esecuzione di un prelievo di sangue periferico in EDTA per approfondimento dell'analisi molecolare mediante sequenziamento diretto del gene ed analisi di grossi riarrangiamenti.

### IMPIEGO DEL TEST GENETICO PER LA DIAGNOSI DI FC

L'analisi molecolare del gene *CFTR* dovrebbe essere sempre associata a un'appropriate consulenza multidisciplinare ed il laboratorio di diagnostica molecolare dovrebbe lavorare in stretta collaborazione con il clinico, in modo da garantire che siano eseguiti i test appropriati per ogni specifica situazione e che siano sempre fornite informazioni corrette e comprensibili al paziente. Infatti, la qualità del risultato finale dipende non solo dalle procedure di laboratorio, ma anche dalle informazioni riguardanti l'anamnesi del paziente, che risultano determinanti affinché il laboratorio possa definire il corretto iter diagnostico, ovvero quali test eseguire e come interpretare i risultati ottenuti. Attualmente, le linee guida suggeriscono l'esecuzione del test molecolare per FC nei seguenti casi (11):

1. sospetto clinico di forma classica di FC (che presenta sintomatologia clinica tipica o fratelli affetti o IRT elevato alla nascita e test del sudore positivo);
2. sintomatologia clinica "atipica" e/o test del sudore *borderline*;
3. infertilità maschile in presenza di agenesia bilaterale congenita dei vasi deferenti (CBAVD);
4. adulti con sospetto di altre forme di *CFTR-RD*;
5. gravidanze in cui il feto presenti intestino iperrecogeno e/o dilatazione delle anse intestinali;
6. diagnosi prenatale;
7. diagnosi di portatore in soggetto con anamnesi familiare positiva.

La diagnosi di portatore in soggetti con anamnesi familiare negativa, così come la diagnosi di portatore nelle coppie infertili, non sono univocamente riconosciute, ma sono regolate dalla politica e dalle specifiche normative adottate a livello di singole nazioni.

### METODICHE

Le metodiche utilizzate per la diagnosi molecolare di FC possono essere divise in due gruppi: le prime ad essere sviluppate sono state quelle che

testano la presenza/assenza di specifiche mutazioni; successivamente, sono state utilizzate metodiche più approfondite, definite di *scanning*, poiché rivelano ogni differenza presente nella sequenza genica del paziente analizzato rispetto alla sequenza di riferimento del gene *CFTR* normale (11).

Poiché le mutazioni del gene *CFTR* hanno diversa frequenza nelle specifiche popolazioni, la strategia più idonea per la diagnosi genetica ed il pannello di mutazioni da analizzare viene definita dai singoli laboratori sulla base della popolazione originaria dei pazienti da analizzare (12, 13). Conoscere l'epidemiologia delle mutazioni responsabili della FC in una determinata popolazione è di fondamentale importanza anche per la consulenza multidisciplinare, in quanto rende possibile calcolare il rischio residuo per una coppia di generare un figlio affetto e per il singolo individuo di essere portatore sano dopo un test che sia risultato negativo.

L'analisi molecolare di I livello utilizza kit commerciali o metodica *home made* che prevedono l'analisi delle mutazioni più frequenti nella regione di riferimento del laboratorio; le metodiche utilizzate per il I livello devono soddisfare criteri di sensibilità, riproducibilità e rapidità.

Il *detection rate* dell'analisi molecolare di I livello è legato al pannello di mutazioni ricercato ed all'origine etnica del paziente analizzato; ma in linea di massima è intorno all'80%.

L'analisi molecolare di II livello: utilizza sistemi di *scanning* che consentono il riconoscimento di variazioni di sequenza nelle porzioni codificanti e nelle regioni di *splicing* del gene.

La tecnica attualmente più utilizzata è il sequenziamento diretto con l'impiego di strumentazioni automatizzate. I test di II livello raggiungono una *detection rate* migliore (circa 92%), ma il significato fenotipico del risultato molecolare non è sempre di semplice interpretazione.

Infine, in alcuni pazienti possono essere presenti macroriarrangiamenti genici, quali macrodelezioni, inserzioni e duplicazioni, che non sono evidenziabili con le metodiche descritte precedentemente; la frequenza di tali riarrangiamenti è stimata essere circa il 2% in alleli da pazienti affetti da FC e circa l'1% in pazienti affetti da CBAVD.

Nei pazienti affetti da *CFTR-RD* le mutazioni presenti sono spesso diverse da quelle rilevabili per mezzo dei kit commerciali, per cui un'analisi di I livello ha una sensibilità minore rispetto ai pazienti con FC classica (8); in questi pazienti è quasi sempre necessario l'approfondimento con *scanning* del gene. Sono, tuttavia, numerosi i casi di forme classiche di FC (con test del sudore francamente patologico) nelle quali, anche dopo un'analisi di II livello, non è possibile identificare entrambe le mutazioni; infatti, mutazioni causative possono essere localizzate in regioni del gene non analizzate (promotore, introni e 3'UTR) o in geni diversi da *CFTR*.

#### DEFINIZIONE DEL CARATTERE CAUSALE DI MALATTIA DELLE VARIANTI DEL GENE *CFTR*

Lo sviluppo di nuove metodiche consente un'a-

nalisi sempre più approfondita del gene *CFTR* e risulta nell'identificazione di un numero sempre maggiore di varianti; la difficoltà attualmente maggiore dell'analisi molecolare della FC, così come delle altre malattie genetiche, non è quella di identificare le alterazioni presenti nella sequenza genica, ma quella di stabilire il significato patogenetico delle mutazioni identificate. Infatti, con il passaggio dall'utilizzo dei kit per mutazioni note alle metodiche di *scanning* del gene *CFTR*, ci si è trovati di fronte non solo a varianti già descritte, ma anche a varianti nuove, mai descritte precedentemente (9).

Alcune varianti sono ben classificate come mutazioni causali di malattia (associate ad FC o a *CFTR-RD*), poiché sono già note come tali o poiché sono nuove ma verosimilmente compatibili con il fenotipo di malattia per caratteristiche proprie della variante (mutazioni *nonsense*, *splice-site*, *frameshift*, grosse delezioni); altre varianti sono già note e classificate invece come polimorfismi non causali di malattia (varianti che non hanno effetto sul fenotipo clinico). Ma per tutte le altre, nonostante lo sviluppo di diversi approcci mirati a definirne il carattere causale o non causale di malattia, il significato resta dubbio, e le linee guida per la refertazione le indicano come varianti probabilmente non patogenetiche o varianti di incerto valore patogenetico (14, 15). Alcuni esempi sono rappresentati dalle varianti *missense* esoniche che ricadono in domini non funzionali della proteina, dalle varianti nucleotidiche sinonime, dalle varianti localizzate in regioni introniche che potrebbero alterare i meccanismi di *splicing* del RNA messaggero, dalle varianti nel promotore (16) e nella regione non tradotta al 3' del gene che, con meccanismi differenti, potrebbero alterare l'efficienza della trascrizione del gene (17).

Per stabilire il carattere causativo o non causativo di malattia di una variante sono oggi possibili due tipi di approcci: i primi sono basati su software informatici, mentre i secondi sono basati sulle sperimentazioni *in vitro*.

Nel primo caso, si tratta di sistemi di predizione informatizzati che forniscono risultati riguardo il grado di conservazione filogenetica dell'aminoacido sostituito, riguardo l'impatto delle mutazioni *missense* sull'attività della proteina canale e riguardo l'eventuale effetto della variante identificata sullo *splicing* dell'RNA messaggero (9).

Questi sistemi di predizione forniscono risultati immediati, ma talvolta contrastanti e non definitivi; pertanto, è sempre necessario utilizzarne un minimo di tre per la valutazione di ogni variante e, in ogni caso, tali risultati non sono utilizzabili in fase di refertazione, ma solo come indicazione a proseguire o meno con successivi approfondimenti *in vitro*.

Le sperimentazioni *in vitro* misurano direttamente l'attività di *gating* del canale *CFTR* (nello studio di varianti esoniche di tipo *missense*) o la quantità di messaggero prodotto (nello studio di varianti nel promotore o nella 3'UTR) o verificano la correttezza del risultato dello *splicing* del mRNA di *CFTR* (18) ed utilizzano metodiche quali: clonaggio genico in vettori, sistemi

reporter che utilizzano geni come luciferasi e GFP (per lo studio sia di elementi cis che trans di regolazione della trascrizione) e sistemi di rivelazione di bioluminescenza e di fluorescenza, trasfezione *in vitro*, colture cellulari, RT-PCR e sequenziamento diretto.

Le sperimentazioni *in vitro* forniscono risultati importanti e definitivi, ma lo fanno in tempi molto più lunghi, cosa che li rende lontani da un utilizzo routinario.

## NEXT GENERATION SEQUENCING

L'orizzonte della diagnostica molecolare della FC e di tutte le malattie genetiche e multifattoriali è destinato a modificarsi completamente nei prossimi anni grazie allo sviluppo recente di tecniche di sequenziamento massivo, definite *Next Generation Sequencing* (NGS); tutte le piattaforme NGS oggi disponibili presentano una caratteristica tecnologica comune: il sequenziamento parallelo massivo di molecole di DNA amplificate in modo clonale (sequenziamento di II generazione, *Next Generation*) o di singole molecole di DNA separate spazialmente in una cella a flusso (sequenziamento di III generazione) (19). Poiché la procedura è parallela e massiva, tali piattaforme consentono di sequenziare da centinaia di milioni di paia di basi fino a miliardi di paia di basi di DNA in un'unica seduta analitica, a seconda del tipo di tecnologia NGS utilizzata. Complessivamente, le piattaforme NGS hanno il vantaggio di sequenziare in tempi e con costi enormemente ridotti rispetto al metodo Sanger, rendendo possibile il completamento in alcune settimane di analisi mentre che con il metodo Sanger avrebbero impiegato anni; sono stati necessari circa 3 miliardi di dollari e 17 anni (dal 1990 al 2007) per il completamento del Progetto Genoma Umano, mentre per rifequenziare il genoma con una piattaforma NGS sono stati necessari due mesi a costi 100 volte inferiori.

L'avvento della tecnologia NGS ha aperto importanti prospettive nella diagnostica molecolare e rappresenta un potente mezzo per l'analisi simultanea di un gran numero di regioni geniche. L'applicazione di questa tecnologia nella diagnostica molecolare della FC consentirà in primo luogo la riduzione dei tempi necessari alla diagnosi genetica nei pazienti affetti portatori di mutazioni rare e la ricerca immediata di mutazioni non esoniche; inoltre, l'utilizzo delle piattaforme NGS consentirà la ricerca immediata di mutazioni in pannelli di geni già noti come geni modulatori dell'espressione fenotipica della malattia (attualmente realizzata principalmente mediante l'uso di *microarray*) ed abatterà i tempi necessari all'esecuzione di studi di ricerca volti all'identificazione più rapida di nuovi geni modulatori. Il problema principale, come già accaduto in precedenza con l'avvento del sequenziamento tradizionale, sarà l'interpretazione dei risultati ottenuti per ogni paziente, poiché il laboratorista ed il clinico si troveranno di fronte ad un gran numero di varianti nuove in assenza di strumenti utilizzabili in *routine* che ne possano definire il carattere causale o non causale

di malattia. Il primo supporto sarà sicuramente rappresentato dalla consultazione di database, quali ad esempio "1000 Genomes", realizzati attraverso studi di NGS su grandi popolazioni, che contengano tutte le variazioni, comuni e rare, dell'intero genoma umano; altrettanto fondamentale sarà la collaborazione di esperti in bioinformatica.

## FLOW CHART PER LA DIAGNOSI GENETICA

Il percorso diagnostico da seguire nella diagnosi molecolare della FC è strettamente dipendente dalla motivazione della richiesta di indagine (quale sospetto di malattia, familiarità, diagnosi di portatore nelle coppie infertili, intestino iperecogeno fetale, consanguineità, diagnosi prenatale), dalla anamnesi clinica del paziente da analizzare e dai valori di eventuali test precedentemente eseguiti (quali dosaggio dell'IRT e test del sudore) (11). Nella condizione di "sospetto clinico" possiamo includere i soggetti con sospetto di forma classica di FC, quelli con sintomatologia clinica "atipica", con infertilità maschile in presenza di CBAVD o con sospetto di altre forme di *CFTR-RD*; la seconda condizione è quella dei soggetti con familiarità per FC e delle diagnosi prenatali (20); la terza condizione è quella di assenza di familiarità ed è il caso delle diagnosi di portatore nelle coppie infertili, delle gravidanze con riscontro di intestino iperecogeno fetale e delle consanguineità.

**Sospetto clinico:** In presenza di sintomi (incluso l'ileo da meconio) o dati clinici (test del sudore o IRT alterato) sospetti per FC classica o *CFTR-RD* ed in caso di infertilità maschile in presenza di CBAVD è indicata l'esecuzione del test genetico. Qualora l'analisi di I livello identifichi entrambe le mutazioni, dopo conferma del genotipo mediante analisi dei genitori, la diagnosi di affetto da FC viene confermata; qualora l'analisi di I livello identifichi una sola o nessuna mutazione è necessario ridiscutere il caso con i clinici per valutare l'utilità di un approfondimento di II livello. Qualora l'approfondimento molecolare si fermi all'identificazione di una sola mutazione in un paziente sospetto per FC classica o di una mutazione ed una variante di incerto significato in un paziente sospetto per forma lieve o *CFTR-RD*, le linee guida suggeriscono l'esecuzione di test funzionali quali test dei potenziali nasali (NPD) e misura della corrente intestinale (ICM).

**Familiarità e diagnosi prenatale:** Nei soggetti che presentino familiarità per FC (o per mutazioni nel gene *CFTR*), in caso di mutazioni note è indicata la ricerca di tali mutazioni seguita dall'analisi di I livello in caso di negatività; qualora il soggetto risulti portatore è indicata l'esecuzione del test genetico anche nel partner. In caso di familiarità ma con mutazioni non identificate, è indicata l'analisi molecolare di I livello direttamente nel soggetto e nel partner. L'identificazione di coppie di portatori (con un rischio di 1:4 di avere figli malati) deve essere seguita da una consulenza multidisciplinare che offra l'opportunità di scelta tra tutte le opzioni dispo-

nibili in virtù degli enormi e continui progressi nella diagnostica di laboratorio (villocentesi e diagnosi prenatale su sangue materno) e delle legislazioni vigenti (diagnosi preimpianto).

La diagnosi prenatale si esegue tramite analisi molecolare su materiale fetale quando entrambi i genitori sono portatori di una mutazione; l'analisi molecolare sul feto è da evitare in assenza di un'indicazione specifica e deve essere preceduta dalla ricerca di mutazioni nei genitori (20).

**Assenza di familiarità:** Nelle coppie infertili, in caso di consanguineità o di gravidanze con riscontro di intestino iperecogeno fetale, la diagnosi di portatore consiste nell'analisi molecolare di I livello in entrambi i componenti della coppia; l'identificazione di un portatore sano in una coppia è seguita, in caso di feto con intestino iperecogeno, da analisi molecolare di II livello nel partner risultato negativo al I livello. Negli altri casi, e riguardo la diagnosi di portatore come *screening* preconcezionale in assenza di rischio aumentato (*screening* nella popolazione generale), la situazione è eterogenea e non esiste ad oggi un consenso Europeo.

In conclusione, sebbene la diagnosi della forma classica di malattia sia affidata alla clinica e mantenga tuttora come *gold standard* l'esecuzione del test del sudore, l'analisi molecolare riveste un ruolo prioritario in diverse situazioni quali ad esempio la diagnosi nei pazienti affetti da forme lievi e da CFTR-RD e lo *screening* a cascata nelle famiglie dei soggetti affetti e portatori. L'analisi molecolare è, inoltre, l'unica opzione esistente in alcune importanti situazioni di rischio aumentato, quali gravidanze con riscontro di intestino iperecogeno fetale e coppie di soggetti portatori che scelgano di sottoporsi a diagnosi prenatale. La diagnosi molecolare consente oggi di intervenire in tutte le fasi della malattia ed anche prima che la malattia stessa

si manifesti (con lo *screening* neonatale) ed ha grande importanza nella formulazione prognostica (Tabella 2). Inoltre, con lo sviluppo di terapie farmacologiche per la correzione del difetto di base, la definizione del genotipo del paziente affetto è diventata di fondamentale importanza non per la diagnosi di malattia, ma per la definizione della terapia (Tabella 2). Questo nuovo approccio terapeutico utilizza particolari molecole che, a seconda del difetto funzionale indotto dalle mutazioni causative di FC, agiscono sulla sintesi, il processamento e la funzionalità della proteina CFTR. Attualmente, si stanno sviluppando tre tipi di farmaci: farmaci per i quali è stata riconosciuta la capacità di bypassare codoni di stop prematuri causati da una mutazione, consentendo la traduzione di proteine wild type; farmaci detti correttori, che hanno dato risultati promettenti nel miglioramento del processamento di CFTR, farmaci detti potenziatori che attivano la proteina CFTR, che sia già correttamente posizionata sulla membrana apicale. In fase di studio sono anche molecole che agiscano sul trascritto di *CFTR* e sulla sua stabilità, determinando un incremento del livello di RNA correttamente processato (21).

**Tab. 2. Applicazioni diagnostiche della diagnosi molecolare in FC**

• <i>Screening</i> neonatale (dopo IRT)
• Conferma diagnostica (nei pazienti sospetti)
• <i>Screening</i> familiare a cascata (ricerca dei portatori)
• <i>Screening</i> del portatore (di massa)
• Formulazione prognostica (correlazione genotipo-fenotipo)
• Guida alla terapia (ricerca di mutazioni sensibili a terapia molecolare)
• Diagnosi prenatale
• Diagnosi preimpianto

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Farrell PM. *The prevalence of Cystic Fibrosis in the European Union*. J Cyst Fibros 2008; 7: 450-453.
- (2) O'Sullivan BP, Freedman SD. *Cystic fibrosis*. Lancet 2009; 373: 1891-1904.
- (3) De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. *Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms*. Thorax 2006; 61: 627-635.
- (4) Salvatore D, Buzzetti R, Baldo E, et al. *An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 4: update 2011*. J Cyst Fibros 2012; 11: 480-493.
- (5) Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. *Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes*. Am J Med Genet 2002; 111: 88-95.
- (6) Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. *Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders*. J Cyst Fibros 2011; 10 2: 86-102.
- (7) Rosenstein BJ, Cutting GR. *The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement*. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. J Pediatr 1998; 132: 589-595.
- (8) Amato F, Bellia C, Cardillo G, et al. *Extensive molecular analysis of patients bearing CFTR-related disorders*. J Mol Diagn 2012; 14: 81-9.
- (9) Poulou M, Fylaktou I, Fotoulaki M, et al. *Cystic Fibrosis genetic counseling difficulties due to the identification of novel mutations in the CFTR gene*. J Cyst Fibros 2012; 11: 344-348.
- (10) Castellani C, Southern KW, Brownlee K, et al. *European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening*. J Cyst Fibros 2009; 8: 153-173.
- (11) Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, et al. *Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendation*. Eur J Hum Genet 2009; 17: 51-65.
- (12) Castaldo G, Rippa E, Sebastio G, et al. *Molecular epidemiology of cystic fibrosis mutations and haplotypes in southern Italy evaluated with an improved semiautomated robotic procedure*. J Med Genet 1996; 33: 475-479.
- (13) Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, et al. *Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations. Correlation With Incidence Data and Application to Screening*. Hum Mutat 2002; 19: 575-606.
- (14) Wallis Y, Payne S, McAnulty C, et al. *Practice Guidelines for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics. Original guidelines ratified by the UK Clinical Molecular Genetics Society and the Dutch Society of Clinical Genetic Laboratory Specialists (Vereniging Klinisch Genetische Laboratoriumspecialisten, VKGL), and updated by the Association for Clinical Genetic Science (ACGS) and the Dutch Society of Clinical Genetic Laboratory Specialists*, pag. 1-16, September 2013.
- (15) Castellani C, Cuppens H, Macek Jr. M, et al. *Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice*. J Cyst Fibros 2008;7:179-196.
- (16) Giordano S, Amato F, Elce A, et al. *Molecular and functional analysis of the large 5' promoter region of CFTR gene revealed pathogenic mutations in CF and CFTR-related disorders*. J Mol Diagn 2013; 15: 331-340.
- (17) Amato F, Seia M, Giordano S, et al. *Gene mutation in microRNA target sites of CFTR gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis?* PLoS One 2013; 8: e 60448.
- (18) Raynal C, Baux D, Theze C, et al. *A classification model relative to splicing for variants of unknown clinical significance: application to the CFTR gene*. Hum Mutat 2013; 34: 774-784.
- (19) Liu L, Li Y, Li S, et al. *Comparison of next-generation sequencing systems*. J Biomed Biotechnol 2012;2012:251364.
- (20) Tomaiuolo R, Nardiello P, Martinelli P, et al. *Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: an experience of 181 cases*. Clin Chem Lab Med. 2013; 51: 2227-2232.
- (21) Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. *New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls*. Pharmacol Ther. In press.

Valeria Raia, Angela Sepe, Fabiola De Gregorio, Antonella Tosco  
Centro Regionale Fibrosi Cistica,  
Dipartimento di Scienze Mediche  
Traslazionali, Università di Napoli  
Federico II

Corrispondenza: Valeria Raia  
email: raia@unina.it

## Lo screening neonatale per la Fibrosi Cistica: quali novità?

*Newborn screening for cystic fibrosis: what news?*

**Riassunto** Lo screening neonatale per la Fibrosi Cistica è una complessa procedura, ormai diffusa in tutto il mondo, che coinvolge i controlli di qualità dei laboratori per la raccolta e analisi dei campioni esaminati (tripsinogeno immunoreattivo, analisi genetica, test del sudore), la comunicazione di diagnosi, la consulenza genetica e il *follow-up* presso i Centri di cura specializzati per la Fibrosi Cistica. Non esiste un algoritmo diagnostico "ideale". È importante una periodica rivalutazione del valore soglia di normalità (*cut-off*) dell'IRT, che rappresenta sempre il I test da effettuare; il II test IRT e il test genetico sono stati introdotti per ridurre i falsi positivi e migliorare l'accuratezza diagnostica.

Vantaggi e svantaggi per ogni programma di *screening* sono stati registrati in termini di specificità, sensibilità, costi, risultati di falsi positivi e negativi, livelli di ansia dei genitori per l'attesa del risultato e diagnosi di forme "atipiche" di Fibrosi Cistica, la cui storia naturale non è ancora nota e che potrebbero non avere necessità di interventi terapeutici.

Mentre sono acclarati gli effetti positivi dello *screening* sull'andamento dello stato nutrizionale, resta ancora controversa la dimostrazione di efficacia del programma di *screening* nel ridurre la mortalità. Tuttavia, è opinione comune che tale programma debba rientrare in quelli dei "diritti umani fondamentali" e debba essere implementato nei programmi di prevenzione sanitaria.

**Parole chiave:** *screening* neonatale, fibrosi, tripsinogeno immunoreattivo, analisi genetica, test del sudore

**Key words:** newborn screening, cystic fibrosis, immunoreactive trypsinogen, genetic analysis, sweat test

### INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC) è la più frequente malattia genetica autosomica recessiva a prognosi severa della popolazione caucasica. È causata da mutazioni del gene regolatore della conduttanza di ioni a livello della membrana epiteliale (CFTR). Ad oggi circa 2000 mutazioni sono state identificate sul gene e di queste quasi 120 sono responsabili della espressione clinica di malattia classica (1).

Lo *screening* neonatale della FC consente di identificare precocemente la malattia, con il vantaggio di avviare un programma di cura prima che si manifestino sintomi evidenti o complicanze irreversibili. In particolare, lo stato nutrizionale e la crescita sono avvantaggiati nei primi anni di vita ed il trattamento mirato delle infezioni respiratorie condiziona una prognosi migliore.

È noto, infatti, che anche nei bambini diagnosticati per *screening* la funzionalità respiratoria tende ad essere precocemente alterata nei primi mesi di vita a causa di una ostruzione bronchiale, anche in assenza di sintomi respiratori (2).

Un ulteriore vantaggio dello *screening* neonatale è dato dalla possibilità di poter fornire precocemente alla coppia di un bambino affetto ed ai familiari un'adeguata consulenza genetica, essendo oggi disponibile la diagnosi prenatale per la FC (3).

Lo *screening* neonatale per FC è una complessa procedura che, oltre a permettere il trattamento di

una popolazione di pazienti diagnosticata potenzialmente in condizione pre-sintomatica, fornisce conoscenze nuove sull'incidenza della malattia e sulla storia naturale della stessa (3).

Si basa su multiple fasi di test effettuati su spot di sangue essiccato. Il primo step consiste sempre nella determinazione della concentrazione della tripsina immunoreattiva (IRT), seguito, nei bambini positivi al test, da altre indagini, che generalmente includono l'analisi delle mutazioni del gene CFTR. Il principale obiettivo consiste nella identificazione di neonati ad elevato rischio di avere la FC; i neonati risultati positivi all'IRT sono sottoposti ad ulteriori test presso centri di diagnosi per la FC per confermare (veri positivi) od escludere (falsi positivi) la diagnosi.

Quasi tutti i Paesi dell'Europa, del Nord America e dell'Australia hanno organizzato un programma di *screening* neonatale al fine di individuare la popolazione a rischio per la malattia, che viene poi sottoposta agli accertamenti specifici per la conferma della diagnosi di FC. I programmi di *screening* neonatale nel mondo hanno avuto date d'inizio e continuano ad avere modalità di esecuzione molto differenti (4).

### PROGRAMMI DI SCREENING

Lo *screening* neonatale per la FC è stato concretamente possibile, alla fine degli anni '70, grazie alla

disponibilità di un test radioimmunologico (5-7) per il dosaggio dell'IRT su sangue, raccolto in 3<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> giornata, adsorbito su carta da filtro e disidratato (*Guthrie card*), procedura già usualmente utilizzata fin dagli anni '60 per l'esecuzione di altri *screening* neonatali.

Successivamente, la possibilità di effettuare saggi immunoenzimatici, implementati mediante analizzatori automatizzati o semiautomatizzati, ha permesso di ridurre gli errori dovuti alla manipolazione dei campioni, di ridurre i tempi di lavoro e di aumentare la specificità e la sensibilità del test. Il razionale per l'impiego di tale test per selezionare alla nascita i bambini con sospetto di FC deriva dal riscontro di valori elevati della tripsina nel sangue dei neonati FC nei primi mesi di vita, probabilmente da attribuire al reflusso della tripsina verso il circolo ematico per la ostruzione dei dotti pancreatici. Valori elevati di IRT si possono comunque trovare anche in soggetti non FC.

Generalmente la soglia di normalità per il primo IRT effettuato in 3<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> giornata è <45-50 ng/ml, da confermare al *re-testing* (secondo test della tripsina, di solito a un mese di vita, con riferimento di valore soglia di normalità più basso).

Comunque, il livello decisionale (*cut-off*) di normalità per l'IRT viene sperimentalmente definito da ogni singolo laboratorio, sulla base dei differenti kit utilizzati, della numerosità della popolazione di neonati considerata e dei protocolli e algoritmi applicati.

La scelta del *cut-off* deriva dall'analisi statistica di un elevato numero di valori di IRT; poiché l'IRT non ha una distribuzione gaussiana, il *cut-off* è definito in base all'analisi dei centili (statistica non parametrica). La scelta del centile al quale fissare il *cut-off* è funzione dei livelli di efficacia del programma di *screening* ed è un compromesso tra esigenza di buona sensibilità e specificità e costi economici e sociali. In genere, si sceglie un valore che stia tra il 99° e il 99,5° percentile di tutti neonati testati. Quindi, solo una piccola parte (tra lo 0,5 e l'1%) seguiranno un iter di approfondimento. È buona regola ricalcolare con regolarità il *cut-off* dell'IRT, basandosi sulla media e la dispersione dei valori nella popolazione.

I primi programmi di *screening* per la FC sono stati attuati con diversi protocolli negli USA e in Europa; si basavano all'inizio sulla ripetizione dell'IRT (*re-testing*); se il II test risultava elevato entro la 6° settimana di vita, si effettuava analisi del test del sudore per la conferma diagnostica. Successivamente, l'analisi genetica per la ricerca delle mutazioni del gene CFTR è stata inserita nei programmi di *screening*, riducendo il numero di falsi positivi e accelerando la fase dell'iter diagnostico. In Italia, nei programmi di *screening* neonatale del Veneto/Trentino Alto Adige e Toscana si è impiegato per molto tempo, nei casi di IRT elevati, in concomitanza con il test genetico, il saggio di lattasi su meconio essiccato, inviato assieme alla *card* per IRT, con apprezzabile incremento di sensibilità e specificità del sistema.

Un gruppo francese (8) ha invece proposto di effettuare il programma di *screening* PAP/IRT attraverso il dosaggio dell'antigene PAP (*Pancreatitis*

*Associated Protein*) determinato su goccia di sangue essiccata, che nel neonato FC risulta elevato presumibilmente per lo stesso meccanismo che determina l'aumento della tripsina.

L'avanzamento delle tecniche di biologia molecolare, attraverso l'uso di diversi kit commerciali che indagano sempre più numerose mutazioni del gene CFTR (anche fino a 150) ha consentito di migliorare il cosiddetto "*detection rate*" nella popolazione screenata negli ultimi anni.

In tal modo, mentre il 90-95% dei bambini con FC è diagnosticato mediante il programma di *screening* IRT/IRT, lo *screening* IRT/DNA, che usa un pannello di mutazioni multiple e direttamente porta al test del sudore, consente di ottenere una sensibilità superiore al 98% per i bambini con valori estremamente alti di IRT. Pertanto, molti laboratori hanno adottato l'analisi genetica come *step* immediatamente successivo al riscontro di IRT elevato (9). In questi casi è importante sempre specificare quante e quali mutazioni sono state esplorate e con quale tecnica è stata eseguita l'analisi, al fine di stabilire la capacità diagnostica del test (*detection rate*).

Un'analisi recente effettuata (4) passa in rassegna tutti i protocolli di *screening* attuati ed in via di attuazione in tutto il mondo, definendo di ciascuna strategia pro e contro in termini di sensibilità, specificità, costi, percentuale di falsi positivi e falsi negativi, probabilità di individuare portatori, livello di ansia generato nei genitori, etc. Lo studio conclude che nessun metodo o strategia è ideale per tutte le realtà regionali; quindi è fondamentale documentare gli esiti, così da poter valutare nel tempo sia i danni sia i benefici.

In generale, i programmi prevedono un primo dosaggio dell'IRT, la ricerca delle più frequenti mutazioni della proteina CFTR nei neonati con valore elevato e il proseguimento delle indagini, con secondo dosaggio di IRT, ampliamento della ricerca genetica (sequenziamento) e test del sudore nei neonati con almeno una mutazione della CFTR e/o con primo valore di IRT molto elevato.

Oggi lo *screening* neonatale per la FC è stato aggiunto ai programmi di prevenzione già esistenti, con una copertura della popolazione in diversi paesi vicina al 100%.

## ESITI DELLO SCREENING NEONATALE

Numerosi studi dimostrano che il decorso clinico della malattia è complessivamente migliore nei pazienti diagnosticati per *screening* alla nascita rispetto a quelli diagnosticati più tardivamente per sintomi.

Tuttavia, la non disponibilità di studi clinici controllati randomizzati e la scarsa disponibilità di studi di coorte prospettici, i limiti metodologici dell'analisi dei parametri clinici riferiti a soggetti diagnosticati per *screening*, paragonati a soggetti diagnosticati per sintomi, provenienti dalla raccolta dati dei diversi registri internazionali, l'evoluzione naturale della malattia e la diversa gestione delle complicanze nei centri specializzati rendono difficile l'interpretazione degli esiti di efficacia nei gruppi messi a confronto.

### Crescita e nutrizione

Diversi studi confermano che la malnutrizione severa è meno frequente nei soggetti screenati e che il migliore stato nutrizionale precoce correla con una migliore funzionalità respiratoria, almeno fino all'età di 8-10 anni. Inoltre, i vantaggi diretti dello *screening* sulla crescita/nutrizione (10) dimostrano che il gruppo dei bambini screenati con insufficienza pancreatica avrebbe un miglioramento di tutti i parametri auxometrici, che dura oltre l'infanzia, con importanti benefici della terapia nutrizionale anche sulla supplementazione vitaminica; in particolare, una precoce introduzione della vitamina E può avere ripercussioni favorevoli sullo stato cognitivo (11).

### Malattia polmonare

A tutt'oggi non vi sono ancora evidenze di significativi vantaggi sull'evoluzione della malattia polmonare. Alcuni studi randomizzati controllati (2,3) effettuati sia in America sia in Europa evidenziano una differenza significativa degli score radiologici in favore del gruppo degli screenati, ma solo fino a 7 anni. Uno studio di coorte australiano mostra un vantaggio significativo a favore dei pazienti screenati fino all'adolescenza, ma il numero dei pazienti arruolati è troppo piccolo per potere raggiungere conclusioni definitive. Altri dati sono comunque a favore di un ritardo nella colonizzazione da batteri gram negativi quale *Pseudomonas Aeruginosa* nei pazienti screenati, infezione che condiziona fortemente sia la morbilità sia la mortalità di questi pazienti.

### Sopravvivenza

Mentre alcuni studi evidenziano una riduzione di decessi per FC nell'infanzia grazie al contributo del programma di *screening* neonatale (12), non sono disponibili studi longitudinali sufficienti a stabilire l'impatto, del programma di *screening* sulla sopravvivenza a lungo termine, soprattutto quando i risultati vengono analizzati in periodi diversi, e non è quindi possibile distinguere l'effetto dello *screening* sugli esiti della malattia dall'effetto del miglioramento del trattamento della malattia avvenuto negli ultimi anni.

### Prevalenza di malattia

Una tempestiva consulenza genetica fornita dopo la diagnosi precoce di FC può favorire il controllo delle nascite di soggetti malati mediante la diagnosi prenatale. Alcuni studi hanno recentemente evidenziato come in alcune aree geografiche un programma di *screening* del portatore applicato sul territorio a coppie cosiddette a rischio (genitori di bambini affetti e coppie sterili) in fase pre-concepimento, non solo ha consentito di accedere a scelte riproduttive informate, ma ha indotto una riduzione dell'incidenza della malattia in alcune aree geografiche (13).

Tuttavia, lo *screening* del portatore non è ancora di *routine* in tutti i paesi e in alcuni stati è proibito dalla legge per motivi etici.

### Costo/Efficacia

Uno dei vantaggi dell'introduzione del program-

ma di *screening* neonatale, aggiunto ai programmi di prevenzione già esistenti, è un costo relativamente basso per una diagnosi precoce, a fronte di costi molto più elevati per la gestione di pazienti diagnosticati per sintomi, considerata una più rapida progressione della malattia e la comparsa di complicanze in questi ultimi casi (14,15).

### LIMITI DELLO SCREENING NEONATALE

#### Falsi negativi

L'evento di una falsa negatività allo *screening* sembra abbastanza raro; alcuni dati provenienti da ricerche degli ultimi anni riportano una frequenza dei falsi negativi fra 1 su 20.000 e 1 su 50.000 neonati screenati. La loro frequenza è difficilmente quantificabile perchè varia in relazione ad una serie di fattori. Tra questi, si distinguono il protocollo di *screening* adottato (bambini sottoposti ad analisi genetica, portatori di mutazioni non inserite nel pannello in uso o soggetti con livelli di IRT inferiori al *cut-off* scelto) e gli anni d'osservazione dopo la nascita (alcune forme di FC possono essere diagnosticate anche molto in là con gli anni) e la capacità di sospettare la FC sulla scorta di sintomi magari molto sfumati da parte dei medici di una regione rispetto ad un'altra.

Per questo, si suggerisce comunque di fare il test del sudore, a qualsiasi età, nei casi con sintomi evocativi, anche se il risultato dello *screening* neonatale era stato negativo.

#### Falsi positivi

L'1,5-2% dei neonati può presentare valori elevati di IRT alla nascita.

Nella massima parte dei casi con *screening* FC positivo alla nascita e normalizzato dopo circa un mese di vita si tratta di risultati "falsi positivi": la FC viene esclusa con esami integrativi adottati dai vari programmi di *screening* e si ha in definitiva una diagnosi di vera FC solo in un caso su 6-10 tra i neonati risultati positivi al test della tripsina.

Tuttavia, un certo numero di "falsi positivi" sono rappresentati da neonati che sono portatori sani delle più comuni mutazioni del gene CFTR identificate attraverso l'analisi genetica di I livello, effettuata sulla stessa goccia di sangue usata per l'esame della tripsina nei casi risultati positivi allo *screening* (neonati quindi con valori di tripsina sopra la soglia di normalità, ma non molto elevati e comunque mediamente più elevati rispetto ai neonati non portatori)(16).

È bene ribadire che, nel caso il test genetico risultasse negativo, non si può escludere al 100% che il neonato sia portatore, perché il test genetico di I livello non individua alcune mutazioni rare o molto rare. In questi casi è possibile estendere la ricerca delle mutazioni mediante test genetico di II livello.

#### Ricadute psicologiche

Lo *screening* neonatale per la FC comporta una ulteriore responsabilità nel provvedere alla consulenza genetica alle famiglie dei bambini positivi al test. Fondamentale dunque uno staff adeguato a gestire un numero elevato di test in tempi brevi

e un'informazione corretta ai genitori in attesa di definizione diagnostica. Ma altrettanto fondamentale sarebbe l'impegno dei gestori dello *screening* e degli operatori delle *nurseries* a fornire adeguate informazioni ai familiari prima della nascita.

Lo *screening* neonatale della FC è una procedura complessa che richiede numerose tappe:

- il prelievo di sangue per il dosaggio della tripsina
- la comunicazione del primo risultato
- la ripetizione del prelievo
- l'attesa per il secondo risultato
- la sua comunicazione
- gli eventuali effetti a distanza dopo aver saputo con certezza che il bambino non era affetto da FC.

Da un'indagine effettuata nel Regno Unito sulle possibili ricadute psicologiche nei genitori in attesa dell'iter diagnostico definitivo per confermare (veri positivi) od escludere (falsi positivi) la diagnosi (17) sono stati evidenziati alcuni importanti suggerimenti per migliorare il servizio di *screening* FC:

- 1) corretta informazione, meglio se scritta, ancora prima del parto, sull'esistenza dello *screening* FC e sulla possibilità che dia risultati sia positivi sia falsi positivi;
- 2) informazioni realistiche sui tempi necessari per avere il risultato del secondo prelievo di tripsina o delle indagini genetiche per contenere l'ansia dell'attesa;
- 3) informazioni essenziali chiare, ma limitate, sui segni e sintomi della FC nel lattante, in modo da contenere la tendenza dei genitori all'ipervigilanza nell'attesa del risultato definitivo;
- 4) riduzione del tempo d'attesa del risultato definitivo della procedura.

## CONCLUSIONI

La FC è una patologia certamente seria, considerate le conseguenze sullo stato di salute e sulla durata della vita. È la più grave e più frequente patologia su base genetica in assoluto; ha ad esempio una frequenza superiore a quella dell'ipotiroidismo congenito e della fenilchetonuria, patologie per le quali è da tempo applicato lo *screening* di massa in epoca neonatale.

L'anticipo diagnostico permette di instaurare precocemente gli interventi terapeutici adeguati (dieta ipercalorica con supplementazione di enzimi pancreatici, fisioterapia respiratoria, terapia antibiotica delle infezioni polmonari e gestione delle complicanze) e permette altresì alle famiglie cui venga diagnosticato un figlio affetto di accedere alla diagnosi prenatale per eventuali gravidanze successive.

Uno degli effetti complementari dello *screening* neonatale è la identificazione dello stato di portatore sano di FC (18).

Diversi studi sottolineano l'importanza di piani comunicativi adeguati per garantire una corretta comprensione del significato dell'essere portatore di una mutazione FC.

L'efficacia dello *screening* sui principali outcome, in termini di guadagno prognostico negli screenati

rispetto ai non screenati, è ancora oggetto di discussione.

Mentre i miglioramenti di natura nutrizionale e auxologica sono abbastanza confermati, ancora non sembrano stabiliti con certezza quelli a livello polmonare e sulla durata di vita. Certamente una diagnosi molto precoce consente di prevenire la malnutrizione, il rischio di morte per la sindrome da perdita di sali e le infezioni respiratorie gravi. Alcuni studi randomizzati controllati e i numerosi studi osservazionali risentono di bias di selezione legati al differente *case-mix* generato dall'anticipazione diagnostica. Lo *screening*, infatti, grazie alla maggiore accuratezza diagnostica del test genetico porta inevitabilmente a diagnosticare, oltre alle forme classiche, anche delle forme meno gravi, alcune delle quali sarebbero comparse in età avanzata, o addirittura non sarebbero state diagnosticate la cui storia naturale non è assolutamente prevedibile.

Il dosaggio dell'IRT come test di I livello sembra assai valido per sensibilità e specificità. I costi del programma di *screening* sono accettabili.

Come per tutti i programmi di *screening* universali, è fondamentale l'aspetto organizzativo, dalla scelta dell'algoritmo diagnostico più accurato alla valutazione continua della qualità dei dati e degli aspetti logistici, procedurali, di monitoraggio e comunicativi.

La presa in carico da parte dei Centri di cura specializzati deve essere tempestiva e adeguata, secondo gli standard di cura più accreditati (19).

Nonostante non siano ancora disponibili definitive evidenze di beneficio clinico, dove sono attuabili le condizioni per un programma di *screening* di diagnosi precoce per la FC è opinione prevalente che un tale servizio vada implementato, secondo le indicazioni suggerite a livello internazionale (Tabella 1) e che tale programma debba rientrare nei "diritti umani fondamentali" delle persone, di cui l'organizzazione sociale e sanitaria devono farsi carico (20, 21).

**Tab. 1.** Direttive per l'implementazione dello *screening* neonatale per FC\*

Fase educativa <i>pre-screening</i>
Algoritmi diagnostici
Report e aspetti educativi <i>post-screening</i>
Percorso diagnostico dopo una positività
Test del sudore
Interpretazione del test del sudore
Comunicazione di diagnosi ai genitori
Counseling genetico
Aspetti di <i>Quality Assurance</i> compresi indicatori, <i>follow up</i> e <i>outcomes</i>
*da American Academy of Pediatrics

Per questo lo *screening* neonatale per la FC è ormai applicato in vaste aree del mondo occidentale e sta ulteriormente espandendosi nei programmi di prevenzione sanitaria.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, et al. *Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*. Nat Genet 2013; 45: 1160–1167.
- (2) Nguyen TT, Thia LP, Hoo AF, et al. *Evolution of lung function during the first year of life in newborn screened cystic fibrosis infants*. Thorax 2014;69:910-917
- (3) Southern KW, Munck A, Pollitt R, et al. *A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe*. J Cyst Fibros 2007; 6: 57–65.
- (4) Wilcken B. *Newborn screening for cystic fibrosis: techniques and strategies*. J Inherit Dis 2007; 30: 537-543
- (5) Geokas MC, Largman C, Brodrick JW, et al. *Determination of human pancreatic cationic trypsinogen in serum by radioimmunoassay*. Am J Physiol 1979; 236: E77-83
- (6) King DN, Heeley AF, Walsh MP, et al. *Sensitive trypsin assay for dried-blood specimens as a screening procedure for early detection of cystic fibrosis*. Lancet 1979; 2: 1217-1219
- (7) Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. *Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn*. Lancet 1979; 1: 472-474
- (8) Sarles J, Berthezene P, Le Louarn C, et al. *Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis*. J Pediatr 2005; 147: 302-305
- (9) Corbetta C, Seia M, Bassotti A, et al. *Screening for cystic fibrosis in newborn infants: results of a pilot programme based on a two tier protocol (IRT/DNA/IRT) in the Italian population*. J Med Screen 2002; 9: 60-63.
- (10) Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, et al. *Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth*. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. Pediatrics 2001; 107: 1-13.
- (11) Koscik RL, Farrell PM, Kosorok MR, et al. *Cognitive function of children with cystic fibrosis: deleterious effect of early malnutrition*. Pediatrics 2004;113;1549-1558
- (12) Lai HJ, Cheng Y, Farrell PM. *The survival advantage of patients with cystic fibrosis diagnosed through neonatal screening: evidence from the United States foundation registry data*. J Pediatr 2005; 147: S57-S63.
- (13) Castellani C, Picci L, Tamanini a, et al. *Association Between Carrier Screening and Incidence of Cystic Fibrosis*. JAMA. 2009; 302: 2573-2579
- (14) Sims EJ, Mugford M, Clark A, et al. *Economic implications of newborn screening for cystic fibrosis: a cost of illness retrospective cohort study*. Lancet 2007; 369: 1187–1195.
- (15) Radhakrishnan M, van Gool K, Hall J, et al. *Economic evaluation of cystic fibrosis screening: a review of the literature*. Health Policy 2008; 85: 133–147.
- (16) Castellani C, Picci L, Scarpa M, et al. *Cystic fibrosis carriers have higher neonatal immunoreactive trypsinogen values than non-carriers*. Am J Med Genet A 2005; 135: 142–144.
- (17) Moran J, Quirk K, Duff AJ, et al. *Newborn screening for CF in a regional paediatric centre: the psychosocial effects of false positive IRT results on parents*. Journal of Cystic Fibrosis 2007; 6: 250-54
- (18) Castellani C, Massie J. *Newborn screening and carrier screening for cystic fibrosis: alternative or complementary?* Eur Respir J 2014; 43: 20-23
- (19) Castellani C, Southern KW, Brownlee K, et al. *European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening*. J Cyst Fibros 2009; 8: 153-173
- (20) Farrell PM. *Is newborn screening for cystic fibrosis a basic human right?* J Cyst Fibros 2008; 7: 262-265
- (21) Buzzetti R, Baronciani D, Mastella G, et al. *Screening neonatale della Fibrosi Cistica. Una rassegna della letteratura*. I Edizione Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica ed. 2008

Valeria Galici, Cesare Braggion  
CRR Toscano per la Fibrosi Cistica,  
AOU Meyer, Firenze

Referente: Dr.ssa Valeria Galici  
Centro Regionale Toscano di Riferimento  
per la Fibrosi Cistica, AOU A. Meyer, Firenze  
email: v.galici@meyer.it

## PROSPETTIVE FUTURE NEL TRATTAMENTO MEDICO DELLA MALATTIA RESPIRATORIA IN FIBROSI CISTICA

*Therapy for cystic fibrosis lung disease: current status and future perspectives*

**Riassunto** La scoperta della possibilità di cura del difetto di base in fibrosi cistica (FC) ha portato al fiorire di numerosi studi volti alla progettazione e alla valutazione di molecole capaci di far funzionare la proteina CFTR difettosa, avendo come bersaglio i diversi difetti associati alle diverse mutazioni del gene CFTR. I farmaci che al momento si stanno rivelando più promettenti sono i potenziatori della CFTR, come Kalydeco. Tale farmaco ha dimostrato efficacia in mutazioni del gene CFTR in cui la proteina è localizzata sulla membrana cellulare, ma non funzionante per un difetto di "gating".

I ricercatori si stanno impegnando anche alla realizzazione di farmaci correttori, che combinati ai potenziatori possano agire su mutazioni più complesse, ma che riguardano un numero maggiore di pazienti con FC (ad es. F508del). Parallelamente a questa ricerca innovativa, continuano gli studi rivolti a bersagli sintomatici, quali l'infiammazione e l'infezione polmonare. Essendo ancora lunga la strada verso la messa a punto di nuovi antibiotici, è attivo lo sforzo delle case farmaceutiche nel fornire nuovi dispositivi per rendere più semplice e facilmente gestibile la somministrazione degli antibiotici per via inalatoria, migliorando l'aderenza terapeutica dei pazienti.

**Parole chiave:** modulatori, correttori, CFTR, terapia genica

**Key words:** CFTR modulator; CFTR potentiator; gene therapy

Negli ultimi anni l'interesse della ricerca di base e clinica nell'ambito della fibrosi cistica (FC) si sta sempre più orientando verso soluzioni terapeutiche innovative volte alla correzione del difetto di base della patologia. Sono stati ottenuti risultati buoni e promettenti per alcune mutazioni della proteina *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*. Parallelamente a questo filone di ricerca, continuano anche gli studi volti alla cura degli aspetti centrali della malattia (terapia dell'infiammazione e dell'infezione polmonare) e l'attenzione delle case farmaceutiche nel fornire dispositivi che consentano un uso più semplice e rapido di farmaci già disponibili, per ottimizzarne l'efficacia e l'aderenza terapeutica.

### FARMACI MODULATORI DELLA PROTEINA CFTR

Per comprendere la modalità con cui la ricerca si sta muovendo nella progettazione e realizzazione di farmaci capaci di far funzionare la proteina di membrana CFTR, alterata nei pazienti con FC, è necessario richiamare brevemente la classificazione delle mutazioni per comprenderne i possibili bersagli terapeutici.

E' risaputo infatti che a mutazioni genetiche diverse corrispondono difetti diversi della protei-

na CFTR.

A tutt'oggi si conoscono più di 1900 mutazioni del gene CFTR, anche se non di tutte è stata riconosciuta l'implicazione funzionale. La mutazione più frequentemente rilevata nel Nord Europa e Nord America è una delezione di tre paia di basi (CTT) nell'esone 10, che corrisponde alla perdita di un residuo di fenilalanina in posizione 508 (F508del). Tale difetto in Italia rappresenta circa il 50% degli alleli, mentre la distribuzione delle altre mutazioni varia da regione a regione.

Le mutazioni FC sono state suddivise in cinque classi, sulla base del difetto che provocano nel processo di sintesi della proteina CFTR, che è una proteina-canale dello ione cloro, localizzata sulla superficie cellulare di molti epitelii (Figura 1):

- **classe I – difetto di sintesi:** causano la totale assenza di sintesi della proteina per alterazioni dello *splicing* o mutazioni *frameshift* e nonsense, che portano, rispettivamente, a instabilità dell'mRNA e interruzione prematura della catena polipeptidica nascente;
- **classe II – difetto di maturazione:** la proteina CFTR viene sintetizzata, ma non raggiunge la membrana cellulare perché la mutazione determina un'anomala conformazione spaziale e successiva degradazione. L'esem-

pio principale è la mutazione F508del;

- **classe III – difetto di attivazione e disattivazione:** la proteina-canale CFTR in questo caso viene sintetizzata e correttamente localizzata, ma non viene attivata o regolata; il canale ha un difetto di apertura (“gating”);
- **classe IV – difetto di conduttanza:** le mutazioni missenso (sostituzione di un amminoacido) cadono nelle regioni trans-membrana, essenziali per il trasporto dello ione cloro, causando quindi una diminuita conduttanza allo ione;
- **classe V – ridotta sintesi:** la mutazione causa instabilità dell’mRNA rallentando la trascrizione genica o creando siti di *splicing* alternativi, causando una sintesi di proteina normale ma fortemente ridotta in quantità.

Nella cellula normale, la proteina CFTR è espressa a livello della superficie cellulare dove funziona come canale per il trasporto del cloro verso l’esterno.

La proteina regola inoltre il canale del sodio ed ha probabilmente anche altre funzioni.

La secrezione di cloro ed il riassorbimento di sodio comportano un passaggio di acqua verso l’esterno e quindi una condizione di adeguata idratazione delle secrezioni a livello dei vari organi: in particolare a livello bronchiale tale condizione favorisce il movimento delle “cilia” e quindi l’eliminazione del muco bronchiale (*clearance* muco-ciliare) e così degli agenti estranei inalati

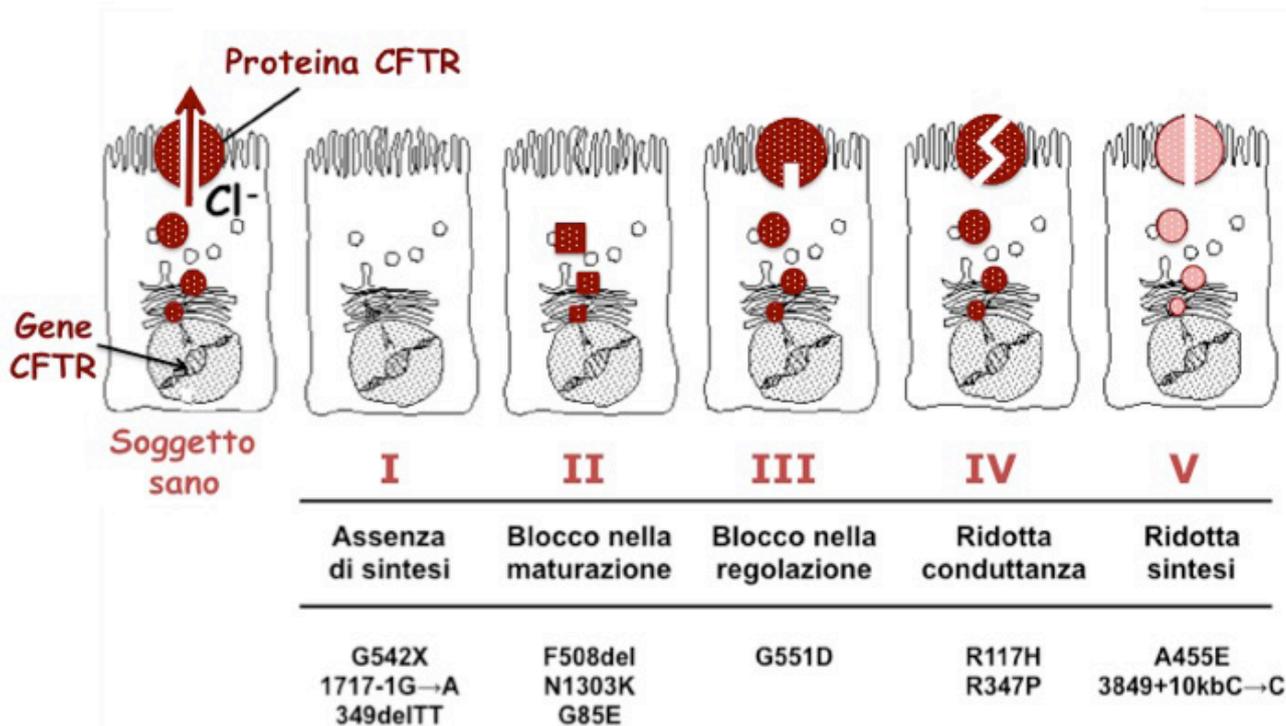
(inquinanti, batteri, etc.). Il mancato funzionamento di questo meccanismo nei pazienti FC è responsabile dell’instaurarsi del circolo vizioso infezione-infiammazione e quindi dei sintomi della malattia polmonare.

La localizzazione della proteina-canale ha determinato il tipo di approccio farmacologico scelto per la sua correzione; se la proteina si localizza nella sua sede abituale (superficie cellulare) il trattamento farmacologico della stessa è facilitato: infatti, nel caso delle mutazioni di questa tipologia (classe III, IV e forse V) vengono studiati farmaci “potenziatori” con lo scopo di ripristinare e appunto potenziare il funzionamento della proteina mutata. Più difficoltoso invece il trattamento farmacologico del difetto nelle prime due classi di mutazioni, dove la proteina CFTR non arriva all’apice cellulare; in tale circostanza ai farmaci “potenziatori”, che stimolino l’attività della proteina, occorre combinare farmaci che facilitino la sintesi o il percorso della proteina fino alla sede appropriata.

Per giungere alla definizione di molecole utili alla correzione o al potenziamento della CFTR, i ricercatori di base hanno messo a punto il sistema dello “screening ad alta efficienza”.

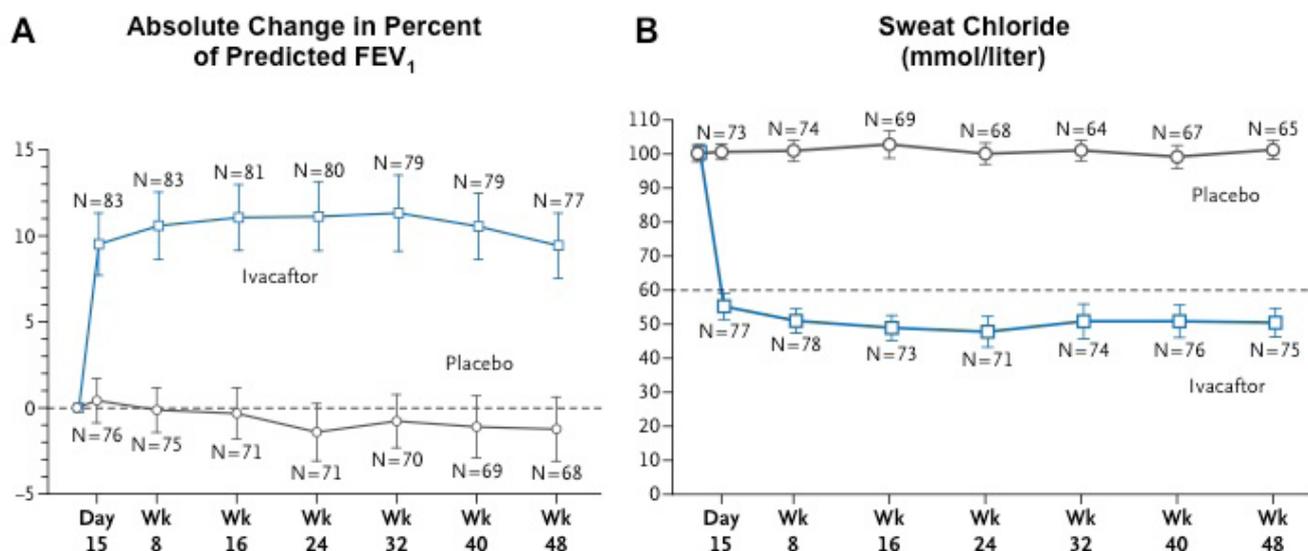
Tale metodica automatizzata ha il compito di saggiare una vasta libreria di farmaci su cellule con specifico difetto della CFTR. Tra i farmaci testati, quelli che si dimostrano più promettenti vengono caratterizzati e perfezionati per l’uso

Fig. 1 Sono illustrate le cinque classi di mutazioni del gene CFTR ed il diverso difetto che esse generano nella proteina-canale CFTR. Nel caso delle mutazioni di classe I e II non c’è proteina CFTR sulla superficie cellulare; nel caso delle mutazioni di classe III, IV e V la proteina CFTR è localizzata nella sede adeguata, ma non è funzionante per ragioni diverse.



Adapted from Cystic Fibrosis Mutation Data Base: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

Fig. 2 Sono illustrate in A le variazioni di FEV<sub>1</sub> nei pazienti trattati con Ivacaftor rispetto ai pazienti trattati con placebo; in B è possibile osservare le variazioni di cloro sudorale. Lo studio ha arruolato 161 soggetti con fibrosi cistica e mutazione G551D di età superiore ai 12 anni. Il potenziatore Ivacaftor è stato somministrato per os per un anno (3).



nell'uomo e, in seguito, avviati a studi *in vitro* e/o nell'animale di laboratorio per testarne efficacia e sicurezza; terminato tale processo, le molecole vengono avviate a studi clinici di fase II e III nel soggetto malato.

I primi studi hanno portato alla scoperta del potenziatore VX 770 – Ivacaftor (Kalydeco), che ha dimostrato, prima negli studi *in vitro* e poi negli studi clinici, di garantire una buona efficacia in pazienti con almeno una mutazione di classe III (es. la mutazione G551D) e di essere discretamente tollerato dagli stessi. I primi studi su Ivacaftor sono stati condotti *in vitro* su cellule bronchiali umane con la mutazione G551D, dimostrando che il farmaco aumentava la durata di apertura della proteina-canale e perciò la secrezione del cloro di circa il 50% rispetto alle cellule normali. Inoltre VX-770, pur non avendo effetto diretto sul canale del sodio, ma agendo su CFTR, riduceva il riassorbimento di sodio. L'effetto combinato sul trasporto di cloro e di sodio produceva un aumento del volume di liquido periciliare sulla superficie delle cellule con mutazione G551D di circa il 50%, normalizzando il battito ciliare (1-2). In seguito a queste premesse sperimentali si è passati a valutare efficacia e sicurezza di VX-770 in pazienti con FC e mutazione G551D.

Uno studio di fase III ha valutato l'efficacia e la sicurezza del farmaco (150 mg per bocca due volte al dì), somministrato per 1 anno, rispetto al placebo in circa 161 pazienti, nei quali una delle due mutazioni era la G551D (3). Come illustrato nella Figura 2, l'assunzione del farmaco si associava ad un aumento in valore assoluto del FEV<sub>1</sub>, espresso in percentuale rispetto al predetto, di 10,5 punti e ad una riduzione dei valori di

cloro sudorale di circa 50 mmol/L (3).

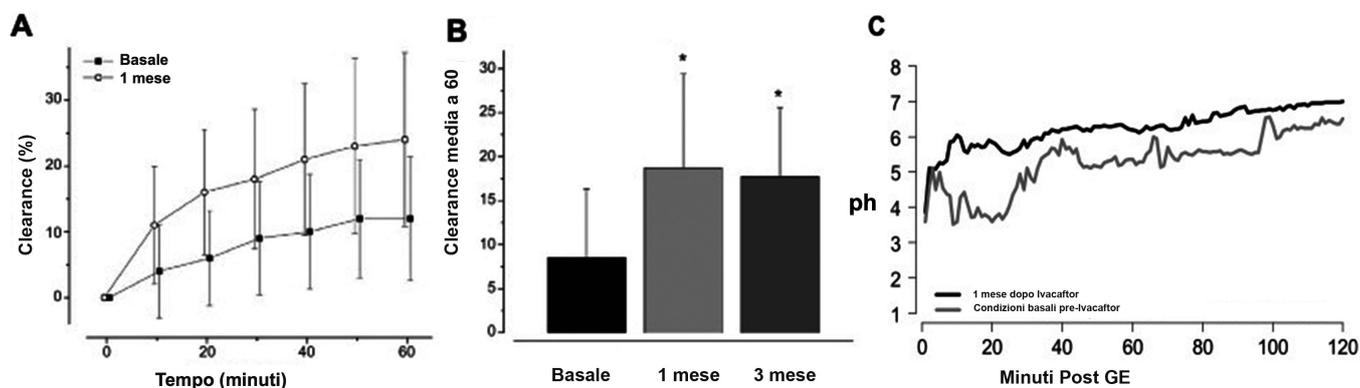
Questi effetti si mantenevano nel tempo e si associavano ad una riduzione del 55% delle riacutizzazioni respiratorie e ad un miglioramento dei sintomi respiratori.

Tali risultati, rilevanti anche da un punto di vista clinico, hanno portato alla commercializzazione del farmaco per questa mutazione, molto rara in Italia, mentre negli USA interessa il 4-5% dei soggetti affetti da FC.

Lo studio GOAL ha valutato i meccanismi alla base di questi buoni risultati ottenuti con l'Ivacaftor: la riduzione del valore di cloro sudorale (riduzione media di 48.1 mmol/L) corrispondeva ad un effettivo miglioramento di attività del canale CFTR (4).

L'aumento statisticamente significativo della clearance mucociliare rendeva ragione del miglioramento della funzione polmonare e le variazioni del pH intestinale, dovute ad aumento del flusso di ioni bicarbonato nella secrezione pancreaticca, rendevano ragione del miglioramento dell'utilizzo degli enzimi pancreatici e quindi di un incremento medio di 2.7 kg di peso rispetto al placebo (Figura 3). Gli stessi risultati clinici sono stati dimostrati anche in soggetti di età compresa tra i 6 e gli 11 anni con FC ed una mutazione G551D (5). Dati preliminari, presentati al Congresso Nord Americano del 2014, hanno mostrato che anche l'elastasi fecale, un indice di funzione secretiva enzimatica pancreaticca, poteva aumentare, almeno in una percentuale di bambini di età compresa tra i 2 e 5 anni, con FC ed una mutazione G551D. Altri dati preliminari hanno evidenziato che l'effetto di Ivacaftor sulla funzione polmonare si mantiene fino a 3 anni (6).

Fig. 3 Lo studio GOAL è stato condotto in soggetti con la mutazione di classe III G551D. E' illustrato in A il guadagno nella clearance mucociliare, valutata con radioisotopi durante 60 minuti, dopo un mese di terapia con Ivacaftor. In B si possono osservare le variazioni medie (1 DS) di clearance mucociliare, 60 minuti dopo l'inalazione di Tc99m-SC, dopo 1 e 3 mesi di terapia con Ivacaftor, rispetto al valore basale ( $p < 0.001$  rispetto al valore basale). In C si può osservare l'aumento del pH nel piccolo intestino in rapporto alla terapia con Ivacaftor per 1 mese: sono indicate le variazioni di pH, misurato ogni minuto, dopo lo svuotamento gastrico (GE).



Risultati positivi con Ivacaftor, paragonabili a quelli ottenuti con la mutazione G551D, sono stati confermati anche in soggetti con altre mutazioni di "gating" della classe III (7-8).

Queste ultime sono più frequenti in Italia rispetto alla mutazione G551D, interessando peraltro non più di 150 soggetti.

Conosciamo risultati preliminari e da confermare dell'uso di Ivacaftor nei soggetti con la mutazione R117H, una mutazione di classe IV, ed in soggetti con mutazioni caratterizzate da una funzione residua della proteina CFTR. Quest'ultima condizione potrebbe interessare i soggetti che mantengono sufficienza pancreatica e quelli con una mutazione missenso, per i quali *in vitro* è stato dimostrato un effetto di Ivacaftor. I risultati ottenuti in tutti questi casi sono peraltro molto variabili e di minor impatto clinico rispetto a quelli ottenuti con Ivacaftor nelle mutazioni di classe III.

L'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) ha approvato il 31.07.2014 l'uso e la commercializzazione di Kalydeco per pazienti FC di età maggiore di 6 anni che abbiano nel loro genotipo almeno una delle mutazioni del gene CFTR con difetto di "gating" (G551D, G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P, G1349D).

L'altra opzione terapeutica, cui guarda attualmente la comunità scientifica con grande interesse, partendo dai risultati incoraggianti di Ivacaftor, consiste nel risolvere il problema delle mutazioni di classe I e II, nel caso delle quali serve, oltre ad un farmaco potenziatore della CFTR, un farmaco "correttore" che faccia arrivare la proteina sulla superficie cellulare.

Attualmente i maggiori sforzi in quest'ambito si stanno concentrando sulla mutazione F508del, che interessa nel mondo l'80-90% delle persone FC e circa il 50% in Italia.

In presenza di questa mutazione, la proteina presenta delle anomalie di conformazione; viene perciò eliminata dai sistemi di controllo cellulari ed arriva in minima quota ( $\approx 5\%$ ) sulla superficie cellulare.

Per questo tipo di difetto sono stati valutati diversi farmaci "correttori", come il VX-809 (Lumacaftor) ed il VX-661. Quest'ultimo correttore avrebbe un'emivita più lunga del VX-809, una migliore tollerabilità e minori interferenze con Ivacaftor. Negli studi *in vitro* sulle cellule bronchiali dei soggetti omozigoti per la mutazione F508del, l'uso combinato del "correttore" VX-809 e del "potenziatore" Ivacaftor ha consentito di aumentare la funzione della proteina CFTR fino al 25% del normale; l'effetto additivo di VX-809 e VX-770 risultava evidente anche per l'incremento del 50% dello spessore del liquido periciliare sulla superficie cellulare (9).

Sono state quindi studiate le dosi più efficaci dei due farmaci in studi di fase II, con i quali è stata anche rilevata una modesta riduzione del cloro sudorale (6-8 mmol/L in media) ma un incremento, rispetto al placebo, del FEV<sub>1</sub> % predetto di circa 6 punti, rispetto al valore basale (10).

Tali risultati hanno dato avvio a due studi internazionali di fase III, che hanno arruolato complessivamente 1000 soggetti circa, omozigoti per la mutazione F508del i risultati preliminari di questi studi hanno dimostrato un aumento medio del FEV<sub>1</sub> % predetto di circa 3 punti in 6 mesi una riduzione significativa del numero di riacutizzazioni delle ospedalizzazioni e un incremento del peso.

Tali risultati sembrano indicare che anche nel caso della mutazione F508del; si può ottenere una correzione del difetto della proteina CFTR, ma che la correzione, al momento, non è sufficientemente "robusta" dal punto di vista clinico

rispetto a quanto ottenuto per le mutazioni di classe III.

Gli studi finora condotti a termine dimostrano quanto sia complesso correggere i difetti di cui è responsabile la mutazione F508del ed hanno fornito conferme sulla necessità di intervenire nel recupero del difetto con almeno due correttori capaci di interagire su passaggi diversi del processo di maturazione di CFTR. La proteina CFTR è composta da 5 domini: 3 presenti nel citoplasma (NBD1, NBD2 e R Domain) e due che attraversano la membrana apicale (TMD1 e TMD2), che si interfacciano tra loro attraverso filamenti. Il difetto indotto dalla mutazione F508del (la mancanza dell'aminoacido fenilalanina in posizione 508 nel dominio NBD1) compromette la conformazione e la maturazione di NBD1 e la stabilità dell'intera proteina, agendo per questo a livello dell'interfaccia tra NBD1 e TMD1. Pertanto diversi dovrebbero essere i bersagli da colpire con distinti correttori (11).

Gli obiettivi cui è rivolta la ricerca al momento attuale sono: la valutazione di tipologie di correttori diversi e più potenti; la combinazione di almeno due correttori con un potenziatore; la possibilità di interferire sui meccanismi di demolizione della proteina CFTR malconformata e perciò sul proteosoma per consentire ad una quota maggiore di proteina di arrivare sulla superficie cellulare.

Anche le mutazioni di classe I (mutazioni stop o missense) sono abbastanza frequenti in Italia (circa il 10% dei pazienti). In tali casi l'RNA-messaggero contiene dei segnali di "stop", che interrompono la sintesi a livello ribosomiale della proteina prima del dovuto, risultandone una proteina troncata e perciò eliminata. Gli studi *in vitro* hanno mostrato che l'antibiotico gentamicina, della classe degli aminoglicosidi, ed un farmaco come l'Ataluren (PTC124) sono in grado di far procedere la sintesi della proteina oltre i segnali di "stop" in modo che venga prodotta una proteina normale (12). Studi preliminari di fase II con Ataluren hanno mostrato una correzione del segnale elettrico della mucosa nasale in circa la metà dei soggetti con queste mutazioni (13-15). Recentemente è stato pubblicato lo studio di fase III con questo farmaco: sono stati arruolati 238 pazienti, di cui 120 hanno fatto terapia con Ataluren, 118 hanno assunto il placebo. Dopo 48 settimane di trattamento non sono state osservate differenze significative del FEV<sub>1</sub> tra i due gruppi; anche il numero delle esacerbazioni polmonari non variava tra i due gruppi (16). Analizzando però i dati per sottogruppi, è stato mostrato che i pazienti trattati con Ataluren ma che non assumevano tobramicina per via aerosolica avevano risultati migliori rispetto a quelli trattati con placebo: il FEV<sub>1</sub> mostrava un miglioramento medio del 5,7% rispetto al valore basale, a confronto del placebo; le esacerba-

zioni respiratorie erano 1,3 rispetto a 2,15 (16). Per questa ragione l'azienda produttrice dell'Ataluren sta predisponendo una ricerca di fase III per la quale verranno arruolati soggetti con mutazioni stop (nonsense) che non abbiano in terapia tobramicina per via inalatoria. Nel frattempo sono state proposte nuove e forse più efficaci molecole per il trattamento di queste mutazioni, principalmente basate su nuovi aminoglicosidi sintetici.

Di interesse anche una proposta venuta da ricercatori Israeliani sulla correzione di alcuni difetti di *splicing*; questi ricercatori hanno lavorato sulla mutazione 3849+10kbC>T con l'uso di nucleotidi antisense.

In sintesi, al momento, si può concludere che disponiamo realmente di un farmaco incisivo sulla proteina difettosa solo per le mutazioni di classe III. Per le altre mutazioni alcuni passi preliminari importanti sono stati già fatti con gli studi *in vitro* e l'avvio di studi clinici anche di fase III.

Gli studi attuali sono volti soprattutto alla ricerca di nuovi farmaci correttori e alla loro combinazione; tali farmaci debbono peraltro superare i diversi step della ricerca sperimentale e clinica prima di poter essere impiegati sul malato.

Spunti innovativi sono stati portati anche in tema di terapia di riparazione genico-cellulare: cellule staminali pluripotenti indotte, che vengono trattate *in vitro* con gene CFTR normale e poi indirizzate a differenziarsi in cellule respiratorie per la riparazione di tessuti polmonari danneggiati. Per realizzare tali approcci e la terapia genica vera e propria occorre un trasportatore o vettore; in generale i vettori più efficienti si sono rivelati alcuni virus, resi innocui, ma si è lavorato anche con vettori non virali (particelle inalate per aerosol) (17-19).

### FARMACI CONVENZIONALI "SINTOMATICI"

Un altro importante tema in corso di approfondimento scientifico è quello del ruolo dell'infiammazione polmonare in fibrosi cistica e delle eventuali terapie per la gestione della stessa, oltre a studi sulla combinazione di effetto di farmaci con attività antiinfiammatoria e di ripristino della funzione CFTR. Oltre alla terapia antiinfiammatoria non steroidea (ibuprofene) e alla terapia con azitromicina (macrolide con elevata attività antiinfiammatoria) sono in corso numerosi trials sull'utilizzo di un inibitore di leucoproteasi secretoria ricombinante (alfa-1 antitripsina), che neutralizza l'effetto dell'elastasi liberata dai neutrofili nel secreto bronchiale (20).

L'annosa questione dell'efficacia della somministrazione aerosolica di glutatione nei pazienti FC, allo scopo di proteggere il polmone dei malati dall'effetto ossidante, è stato chiarito da uno

studio clinico randomizzato e controllato con placebo pubblicato nel 2013 (21). Tale studio non ha dimostrato miglioramenti importanti della funzionalità polmonare e del rischio di ricattizzazioni nei pazienti FC rispetto al placebo. Non sono stati riportati miglioramenti nella qualità di vita dei pazienti; inoltre il trattamento non ha modificato lo stato ossidativo, né il bilancio proteolitico e infiammatorio dell'essudato.

**Tab. 1** Sono riportati gli studi placebo-controllati e di comparazione che hanno portato alla commercializzazione di tobramicina, colistina ed aztreonam lisina somministrati per via inalatoria per il trattamento dell'infezione polmonare cronica da *Pseudomonas aeruginosa*. Un ciclo di terapia ha una durata di 28 giorni; nel caso di più cicli, questi sono intervallati da periodi di 28 giorni senza terapia (on-off). La colimicina è stata invece somministrata continuamente per tre mesi.

	Non Inferiorità	Superiorità	
		Studi controllati con placebo	Studi in aperto, randomizzati, di comparazione di efficacia
Tobramicina in soluzione (TIS)	3 cicli	-	-
Tobramicina in polvere (TIP)	1 ciclo	TIS	-
Colimicina in soluzione (CS)	3 mesi	TIS	-
Colicistina in polvere (CP)	-	TIS	-
Aztreonam lisina (AZLKI)	1 ciclo	-	TIS

Questo studio ha quindi confutato l'ipotesi che il glutatione, ai dosaggi impiegati, possa rappresentare un approccio terapeutico utile nei pazienti FC.

In merito a terapie considerate più tradizionali per la gestione dell'infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* dei pazienti FC, un tema ancora "caldo" è quello degli antibiotici per via inalatoria; le case farmaceutiche si sono rivolte al miglioramento dell'aderenza terapeutica dei pazienti FC, con l'utilizzo di nuovi dispositivi per la somministrazione degli stessi.

La Tabella 1 mostra gli studi controllati con placebo e comparativi, che hanno portato all'approvazione e alla commercializzazione di tobramicina, colistina ed aztreonam lisina per via inalatoria (20, 22, 23). La tobramicina è il farmaco, che presenta più studi clinici indirizzati a dimostrarne l'efficacia e la sicurezza. Si stanno completando gli studi clinici per l'utilizzo anche della Levofloxacina, della Vancomicina in soluzione e dell'Amikacina liposolubile (23).

Gli antibiotici per via inalatoria rappresentano un caposaldo anche per la terapia eradicante di *Pseudomonas aeruginosa*, che avviata anche in assenza di sintomi ha lo scopo di ritardare l'infezione cronica, caratterizzata dalla trasformazione fenotipica del batterio e perciò dalla formazione di "biofilm" non aggredibile dagli antibatterici e dai neutrofili (23).

La terapia della pneumopatia comprende anche farmaci per via inalatoria mirati alla mucolisi. L'RhdNase, che riduce la viscosità del muco bronchiale demolendo le molecole di DNA, è stato valutato in numerosi studi clinici; L'ipertonica salina, a concentrazioni pari al 7%, ha la finalità invece di aumentare, per effetto osmotico, la componente idrica del muco bronchiale (20).

L'ottimizzazione della terapia con tutti questi farmaci "sintomatici" ha contribuito al miglioramento della sopravvivenza registrato negli ultimi due decenni.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1) Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, et al. *Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770*. PNAS 2009; 44: 18825-18830.
- (2) Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, et al. *Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation*. N Engl J Med 2010; 363:1991-2003.
- (3) Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. *A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation*. N Engl J Med 2011; 365:1663-1672.
- (4) Rowe SM, Heltshe SL, Gonska T, et al. *Clinical mechanism of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator ivacaftor in G551D-mediated cystic fibrosis (GOAL)*. Am J Respir Crit Care Med 2014;190:175-184.
- (5) Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, et al. *Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation*. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187:1219-1225.
- (6) McKone E, Borowitz D, Drevinek P, et al. *Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the G551D-CFTR mutation: response through 144 weeks of treatment (96 weeks of Persist)*. Nord American Cystic Fibrosis Conference 2013. Pediatr Pulmonol 2013; 48 S287 (Abs 227).
- (7) Yu H, Burton B, Huang CJ, et al. *Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations*. J Cyst Fibros 2012; 11: 237-245.
- (8) De Boeck K, Munck A, Walker S, et al. *Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation*. J Cyst Fibros 2014; 13:674-680.
- (9) Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, et al. *Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809*. PNAS 2011; 108:18843-18848.
- (10) Boyle MP, Bell S, Konstan M, et al. *The investigational CFTR corrector, VX-809 (lumacaftor) co-administered with the oral potentiator ivacaftor improved CFTR and lung function in F508del homozygous patients: phase II study results*. Nord American Cystic Fibrosis Conference 2012. Pediatr Pulmonol 2012; 47: S315 (Abs 260).
- (11) Okiyonedo T, Veit G, Dekkers JK, et al. *Mechanism-based corrector combination restores DF508-CFTR folding and function*. Nature Chem Biol 2013; 9: 444-454.
- (12) Ming D, Liu X, Welch EM, et al. *PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model*. PNAS 2008; 105:2064-2069.
- (13) Kerem E, Hirawat S, Armoni S, et al. *Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial*. Lancet 2008; 372:719-727.
- (14) Sermet-Gaudelus I, De Boeck K, Casimir GJ, et al. *Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med 2010; 182:1262-1272.
- (15) Wilschanski M, Miller LL, Shoseyov D, et al. *Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis*. Eur Respir J 2011; 38: 59-69.
- (16) Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, et al. *Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. Lancet Respir Med 2014; 2: 539-547.
- (17) Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. *Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B*. N Engl J Med 2011; 365: 2357-2365.
- (18) Hyde SC, Gill DR, Higgins CF, et al. *Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy*. Nature 1993; 362, 250-255.
- (19) Burney TJ, Davies JC. *Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis*. Appl Clin Genet 2012; 5: 29-36.
- (20) Mogayzel PJ, Naureckas ET, Robinson KA, et al. *Cystic fibrosis pulmonary guidelines. Chronic medications for maintenance of lung health*. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187: 680-689.
- (21) Griese M, Kappler M, Eisman C, et al. *Inhalation treatment with glutathione in patients with cystic fibrosis: a randomized clinical trial*. Am J Respir Crit Care Med 2013; 188: 83-89.
- (22) Ryan G, Singh M, Dwan K. *Inhaled antibiotics for long-term therapy in cystic fibrosis (Review)*. Cochrane Database of Systemic Reviews 2011, Issue 3. Art. No.: CD001021.
- (23) Doering G, Flume P, Heijerman H, et al. for the Consensus Study Group. *Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies*. J Cyst Fibros 2012; 11: 461-479.

Elisabetta Bignamini  
Direttore SC Pneumologia  
CRR Riferimento diagnosi e cura  
fibrosi cistica Piemonte – Valle d'Aosta  
CRR Insufficienza Respiratoria  
Cronica in età evolutiva  
Ospedale Regina Margherita  
AOU Città della Salute e della Scienza  
di Torino

Corrispondenza: Elisabetta Bignamini  
email: ebignamini@cittadellasalute.to.it

## STANDARD E QUALITÀ DI CURE NEI PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

*Standards and quality of care in cystic fibrosis*

**Riassunto** In fibrosi cistica, malattia cronica complessa, il concetto di qualità delle cure è strettamente legato e dipendente dalle performance del modello organizzativo in cui si colloca.

Il “linguaggio della qualità”, con i requisiti di struttura, processo ed esito, è entrato presto nei Centri specializzati per la fibrosi cistica, spesso però dimenticando che l'avanzare delle nuove terapie ed il miglioramento della tecnologia e, quindi, complessivamente del *Know-how* che si traduceva in un alto livello di qualità delle cure professionali poteva non rispondere pienamente alle aspettative dei pazienti proprio in termini di qualità.

La migliore qualità dei sistemi sanitari è raggiungibile solo se vi è un lavoro di condivisione di standards, obiettivi e finalità delle cure tra tutti gli attori, in un rapporto di parità decisionale e di giudizio.

**Parole chiave:** fibrosi cistica, standard di cura, qualità delle cure, benchmarking, registri di malattia

**Key words:** cystic fibrosis, standard of care, quality of care, benchmarking, patients registries

### INTRODUZIONE

La riduzione delle risorse disponibili, anche nel campo della sanità pubblica, ha portato a ragionare sempre più in termini di qualità delle cure, ossia di fare solo ciò che è utile (efficacia teorica), nel modo migliore (efficacia pratica), con il minor costo (efficienza), soltanto a chi ne ha veramente bisogno (appropriatezza), nel rispetto della competenza professionale di tutti gli attori e nella ricerca comune dei risultati migliori possibili per quel paziente, con quella patologia ed in quel contesto.

In fibrosi cistica, malattia cronica complessa, il concetto di qualità delle cure è strettamente legato e dipendente dalle performance del modello organizzativo in cui si colloca.

Per questo, già da metà del secolo scorso, particolarmente per opera della *Cystic Fibrosis Foundation*, in Nord America sono nati i primi confronti su ampia scala tra gruppi di pazienti afferenti a centri di cura diversi sulla applicazione di terapie e modalità di follow-up e sui risultati ottenuti in termini di sopravvivenza, frequenza delle infezioni respiratorie andamento della funzionalità respiratoria e stato nutrizionale. Da queste esperienze prendono il via i registri di malattia, raccolti a livello nazionale ed internazionale, che costituiscono uno dei più importan-

ti strumenti di lavoro per confrontare e definire standards di cura, permettendo anche lo sviluppo di piani di studio e di ricerca per migliorare la conoscenza della malattia, per valutare l'efficacia del sistema di cura, ma soprattutto, la qualità delle cure stesse.

A livello europeo, la pubblicazione nel 2005 del documento “*Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus*” (1) ha posto interrogativi sulla applicabilità ed il confronto di standards nelle diverse realtà nazionali ed ha aperto un percorso che ha condotto alla costituzione di un nuovo gruppo di lavoro europeo formato da esperti della materia, tecnici e pazienti ed alla pubblicazione, nel 2014, di tre documenti di consensus di riferimento, uno dei quali proprio in tema di *Quality Management* (2,3,4).

In Italia si è creata, storicamente, una situazione particolarmente favorevole al confronto, in quanto una legge dello Stato (Legge n.548/93) ha definito le finalità e dato le indicazioni per la costituzione di centri regionali di riferimento per lo studio, la diagnosi e la cura della fibrosi cistica, che si sono sviluppati a partire dal 1994, anche se esperienze di centri destinati alla esclusiva cura della fibrosi cistica erano già presenti precedentemente. In seguito alla pubblicazione del documento europeo del 2005, è iniziato a

partire dal 2006 (5) il lavoro di una commissione della Società Italiana Fibrosi Cistica (SIFC) che, in un primo momento, si è occupata di verificare l'applicabilità degli standards europei, per poi ampliare la visuale, passando da un'ottica esclusivamente di conteggio delle risorse disponibili per i centri a quella di valutazione della qualità delle cure applicate in quel centro. Tutto ciò è stato reso possibile grazie al coinvolgimento e all'impegno dell'Associazione di pazienti (LIFC: Lega Italiana Fibrosi Cistica del Piemonte e Nazionale) al supporto tecnico della Società Italiana per la Qualità e lo Sviluppo dell'Assistenza Sanitaria. Punti di forza sono stati la costruzione del "Manuale per l'autovalutazione e la revisione tra pari della qualità dei centri di riferimento per la fibrosi cistica" (6), in cui i requisiti sono stati definiti partendo da Linee Guida e documenti di consensus nazionali ed internazionali, in un'ottica di parità di tutti gli attori, professionisti della salute e pazienti/famiglie, e l'ampio confronto su scala nazionale che ha preceduto la pubblicazione e messa a disposizione dello stesso. E a darvi pratica attuazione vi è un gruppo di auditors formati, che eseguono visite di accreditamento di qualità, per conto di SIFC e LIFC, nei Centri Italiani.

## TERMINOLOGIA E DEFINIZIONI

**Gli standards**, intesi come valori misurabili di performance che descrivono la qualità delle cure da raggiungere sulla base delle migliori evidenze scientifiche disponibili o, nel caso queste non lo siano, sulla base dell'opinione degli esperti, sono il riferimento indispensabile di valutazione della qualità delle cure. Essi sono caratterizzati da: livello minimo accettabile, livello di eccellenza e range di accettabilità; devono essere quantificabili, chiari ed espliciti, coerenti con scopi e motivazioni dei servizi, realizzabili e controllabili con procedure definite. In fibrosi cistica il confronto nato tra pazienti seguiti in centri differenti ha condotto a definire standards in modo assai precoce rispetto ad altre patologie croniche, aprendo così la strada verso un nuovo modo di pensare la cronicità (7).

Il "linguaggio della qualità", con i requisiti di struttura, processo ed esito, è entrato presto nei Centri specializzati per la fibrosi cistica, spesso però dimenticando che l'avanzare delle nuove terapie ed il miglioramento della tecnologia e, quindi, complessivamente del *Know-how* che si traduceva in un alto livello di qualità delle cure professionali (8), poteva non rispondere pienamente alle aspettative dei pazienti, proprio in termini di qualità.

Nel 1979 A. Donabedian (9) descriveva come la qualità delle cure fosse un concetto in cerca di una definizione. Il suo lavoro sottolineava molto bene la necessità di considerare, a livello di definizione, sia gli aspetti tecnici sia quelli da lui definiti "interpersonali", che comprendevano le aspettative del paziente, il ruolo della Società (in senso lato) e il rispetto delle norme

professionali. Rimarcava inoltre l'importanza di considerare i costi nella valutazione della qualità delle cure, per evitare una definizione "absolutist" della qualità. Nel 1988, lo stesso autore sottolineava come fosse impossibile fino a pochi anni prima anche solo pensare di misurare la qualità, ritenuta reale, percepita ed apprezzata, ma comunque connotabile come un qualcosa di per sé misterioso e non misurabile (10).

A distanza di alcuni decenni, il problema è ancora attuale: quali sono gli elementi che devono entrare in una definizione di qualità delle cure, in particolare per una patologia cronica e complessa, come la fibrosi cistica? Come scegliere gli standards di riferimento per la valutazione della qualità? Chi deve decidere che cosa sia qualitativamente meglio per il paziente/famiglia? Esiste una qualità diversamente misurabile per professionisti, società e paziente/famiglia? Dobbiamo semplicemente aggiungere una "scala" che misuri la qualità della vita e del benessere del paziente (11) alle nostre altre valutazioni cliniche ed ai tradizionali outcomes, quali ad esempio i valori di funzionalità respiratoria o lo stato nutrizionale?

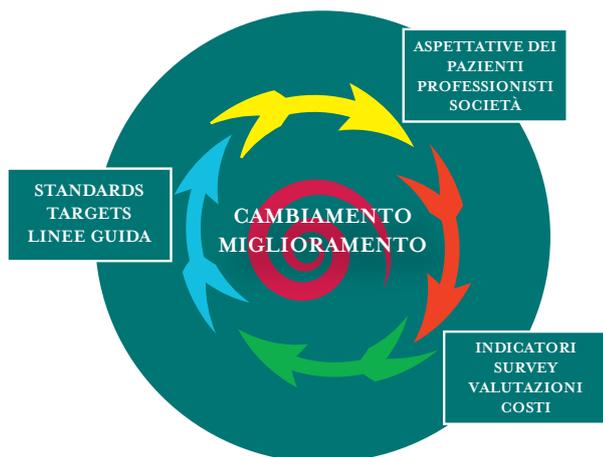
Se consultiamo la Letteratura, troviamo differenti risposte. Una, in particolare, mi ha colpito, sia perché proviene da un'autorevole fonte, sia per la sua intrinseca semplicità: "Health care quality is getting the right care to the right patient at the right time – every time" (12).

M.O. Campbell e colleghi invece scrivono: "Our definition of quality of care for individuals is: whether individuals can access the health structures and processes of care which they need and whether the care received is effective" (13).

La differenza fondamentale tra queste due definizioni è che nella prima il paziente è un'entità passiva, a cui si somministra la giusta cura, nel migliore dei modi. Nella seconda – ed è per questo che la condivido maggiormente – il paziente, persona attiva, dotata di pensiero ed azione, può accedere facilmente alle cure necessarie di cui ha bisogno e ivi trovare la cura più efficace. Quindi **accessibilità ed efficacia**. Una visione d'insieme ci viene poi da P.B. Batalden e F. Davidoff, che definiscono la qualità delle cure "as the combined and unceasing efforts of everyone – healthcare professionals, patients and their families, researchers, payers, planners and educators – to make the changes that will lead to better patients outcomes (health), better system performance (care) and better professional development" (14).

Per concludere, un altro punto importante da sottolineare è quello che **la qualità è un concetto dinamico** e non statico ed è rappresentabile in un ciclo di miglioramento continuo, che ha come elementi fondamentali strumenti tecnici, quali misurazioni, indicatori e *survey*, riferimenti scientifici, come le linee Guida, gli standards e gli obiettivi proposti e riscontri pratici, quali i costi e la presenza attiva dei pazienti/famiglia, professionisti e Società (15). (Fig 1)

Fig.1 Ciclo della qualità. Modificato da Shaw et al (15).



### STANDARDS E QUALITÀ DELLA CURA: LIVELLI DI APPLICAZIONE E VALUTAZIONE IN FIBROSI CISTICA

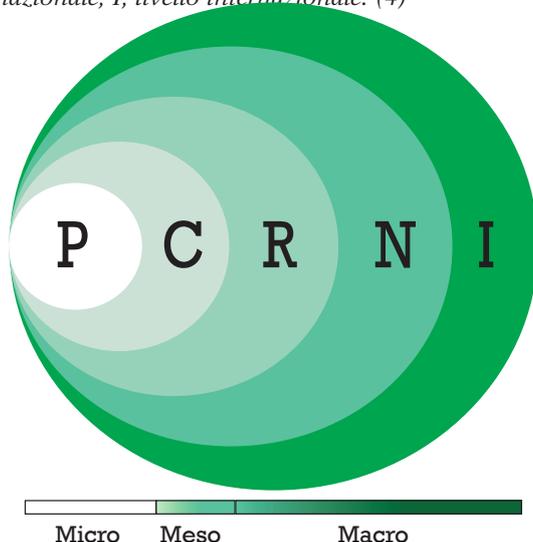
Gli standards e la qualità delle cure possono essere applicati, valutati e gestiti a vari livelli (micro, meso e macro), che sono fortemente interconnessi e, nell'insieme, costituiscono il panorama complessivo in cui si muove il malato affetto da fibrosi cistica. (Fig 2)

Di seguito sottolineo brevemente i principali elementi di valutazione della qualità delle cure, ai vari livelli, seguendo principalmente le indicazioni del documento europeo citato (4).

#### Il paziente

Il paziente/famiglia è parte integrante ed attiva per lo sviluppo di un programma di miglioramento della qualità delle cure e vi è interdipendenza tra paziente/famiglia e specialisti, che solo lavorando insieme possono creare il miglior sistema di cura possibile (16).

Fig. 2 Livelli del quality management in Cystic Fibrosis. Legenda: P, paziente; C, centro; R, livello regionale; N, livello nazionale; I, livello internazionale. (4)



La visita medica periodica deve essere un momento di condivisione di informazioni, ognuno per le sue competenze, da parte dei professionisti e da parte del paziente/famiglia, esperto nel confronto quotidiano con la malattia fibrosi cistica, con condivisione chiara e definita del piano di *follow up* ed informazioni dettagliate sulle terapie prescritte, favorendo il dialogo ed il confronto su ogni questione ritenuta opportuna dagli uni o dagli altri. È indicata una valutazione periodica della qualità della vita e della soddisfazione del paziente.

È stata pubblicata recentemente un'ampia *survey* sulla fibrosi cistica vista dagli occhi dei pazienti, che ha coinvolto 90 Centri specialistici della Germania ed ha rivelato, a fronte di una generale soddisfazione dei pazienti sulla qualità delle cure mediche erogate, ancora problemi sui temi della comunicazione, dell'informazione e dell'educazione (17). È importante non tralasciare questi aspetti come essenziali, per il paziente, per ottenere la migliore qualità delle cure.

#### Il Centro

Il Centro di riferimento per il paziente e la sua famiglia è il luogo di incontro con il team multidisciplinare e multi-professionale esperto della malattia.

Vi è stata molta enfasi in passato sulla necessità di riunire in pochi centri le competenze per la cura della fibrosi cistica e sulle differenze di *follow-up* ed esito clinico nei pazienti trattati in sedi a diverso livello di specializzazione (18).

In termini di miglioramento della qualità, il Centro deve essere inserito in una rete di confronto nazionale ed internazionale, utilizzando gli strumenti a disposizione, quali l'accreditamento tra pari, l'invio dei dati al Registro nazionale, il seguire le linee guida e le raccomandazioni nazionali ed internazionali e la partecipazione attiva ai convegni/corsi specifici in tema di fibrosi cistica.

#### La Regione e la Nazione

A livello regionale o nazionale, a seconda delle diverse realtà europee, la qualità delle cure può essere migliorata formando gruppi di lavoro, costituendo *Learning and Leadership Collectives* (LLC), per esempio basati sul *Darhmouth Institute Clinical Microsystem Approach*, come negli U.S.A. (19), o utilizzando sistemi quali il *benchmarking*.

La pratica clinica del *benchmarking* consiste in un processo di confronto strutturale e nella condivisione delle *best practice* riguardanti gli aspetti clinici della cura, fornendo un approccio basato sullo sviluppo della cultura della qualità delle cure. Per esempio, un problema molto frequente nel trattamento dei pazienti con fibrosi cistica è quello di capire quale approccio terapeutico dia un vero "valore aggiunto" in termini di qualità delle cure ed esiti clinici. I *trials* sono sicuramente uno strumento importante, ma, in un'ottica di *benchmarking*, lo sono ancora di più i dati dei registri o i confronti di parametri chiaramente individuati tra centri che hanno approcci differenti (20).

Criteri di *benchmarking* e revisione tra pari sono solitamente la leadership, l'accesso alla cura, il controllo delle infezioni, il test del sudore, le modalità di *follow-up*, e le *survey* di soddisfazione del paziente (4).

Il *benchmarking* supporta l'utilizzo di strumenti quali i cicli *Plan Do Study Act* (PDSA), ove *Plan* definisce il cambiamento che deve essere testato o implementato, *Do* è l'azione del portare avanti, il test o il cambiamento, *Study* è lo studio dei dati prima e dopo il test/cambiamento e la riflessione su che cosa si è imparato ed *Act* è l'azione di programmazione del nuovo ciclo di cambiamento o la piena applicazione implementazione dello stesso (21).

È inoltre fondamentale che vengano adottate e contestualizzate linee guida internazionali e promossi programmi di revisione tra pari e di accreditamento nazionale di qualità dei Centri.

Questi strumenti servono per proporre programmi di miglioramento a livello di politica della salute regionale e nazionale, quale ad esempio è stata, in molte realtà, l'estensione su tutto il territorio nazionale dello screening neonatale.

Nella tabella 1 sono riportate alcune strategie ed esperienze di miglioramento della qualità a livello europeo.

I registri hanno un ruolo fondamentale a livello nazionale, come già evidenziato in precedenza, in quanto in grado di fornire dati sulle caratteristiche dei pazienti, le terapie effettuate e gli esiti clinici, indispensabili riferimenti per la definizione di standards e il miglioramento della qualità.

### La realtà internazionale

Come riportato dal documento europeo citato (4), per poter definire un processo internazionale di miglioramento della qualità è necessario trovare accordo sulla scelta degli indicatori di monitoraggio della qualità, l'approccio ai dati raccolti nei registri (bias, fattori confondenti), l'applicazione di cicli di PDSA e la *governance* dei processi di *quality management*. È inoltre importante il coinvolgimento del paziente/famiglia ad ogni livello di monitoraggio del processo di qualità. In Europa un'importante attività di confronto è svolta all'interno della *European Cystic Fibrosis Society*, con gruppi di lavoro e promozione e sostegno di progetti quali quelli di Euro-Care CF (22) e di registro Europeo (23).

È attiva anche un'assemblea delle Associazioni dei pazienti, che si confrontano ed hanno voce nelle iniziative della Società Scientifica CFE (24).

**Tab. 1** Strategie ed esperienze di miglioramento della qualità a livello europeo. Legenda: LLC, Learning and Leadership Collectives. Modificato da Stern et al. (4).

Nazione	Strategia di miglioramento	Principi – iniziative
Francia	LLC e best practice	Sviluppo professionale continuo
Germania	Benchmarking e best practice. Certificazione dei centri	Valutazione di esito della qualità delle cure per il paziente
Italia	Accreditamento e valutazione tra pari. Certificazione professionale di qualità dei Centri Regionali	Coinvolgimento dei pazienti/famiglie come pari, anche nel processo di certificazione di qualità e visita dei Centri
UK	LLC e programmi di revisione tra pari	Valutazione di esito della qualità delle cure per il paziente e dei processi (aderenza alle linee guida)

### CONCLUSIONI

Il miglioramento della qualità delle cure, anche a fronte delle nuove terapie e modalità di somministrazione di farmaci disponibili in fibrosi cistica, è un processo che vede coinvolti, come pari, tutti gli attori, ovvero professionisti della salute, pazienti/famiglie e portatori di interesse in senso lato (*stakeholder*), nel loro contesto sociale e culturale.

L'attenzione rivolta a livello nazionale ed internazionale sul tema della qualità in fibrosi cistica ha fatto sì che si aprisse un confronto di ampio respiro, con la costruzione di modelli di analisi utili anche per altre patologie croniche. Lavorare per "la qualità" significa cambiare prospettiva o, meglio, modo di pensare e vedere la medicina, tradizionalmente stretta nei vincoli dei numeri e dei risultati; identificandola come dialogo e confronto con altri protagonisti del mondo della salute, quali i pazienti e le loro famiglie, con la finalità di dare una risposta olistica ai bisogni dei pazienti. In questo, la fibrosi cistica ha aperto una nuova strada.

*"The heart of quality is not a technique, no matter how good. Quality is about people, passion, consistency and pride. It relies on people's good reaction"* – Tom Peters (25).

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Kerem E, Conway S, Elborn S, et al. *Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus*. (2) *J Cyst Fibros* 2005; 4: 7–26.
- (3) Conway S Balfour-Lynn IM, De Rijcke K, et al. *European Cystic Fibrosis Society Standard of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre* *Journal of Cystic Fibrosis*.
- (4) Smyth A.R. et al *European Cystic Fibrosis Society Standard of Care: Best Practice guidelines*. *Cyst Fibrosis*. 2014; 13: S23–42.
- (5) Stern M. Bertrand DP, Bignamini E, et al *European Cystic Fibrosis Society Standard of Care: Quality Management in cystic fibrosis*. *Cyst Fibrosis* 2014; 13: S43–59.
- (6) Braggion C. Alatri F, Conese M, et al. *National scientific associations should have a key role in adapting and implementing standard of care guidelines in European countries*. *Cyst Fibrosis* 2005; 4: 271–272.
- (7) <http://www.sifc.it/>
- (8) Stevens DP, Marshall BC. *A decade of healthcare improvement in cystic fibrosis: lessons for other chronic diseases* *BMJ*. *Qual Saf* 2014; 23: i1–2
- (9) Quon B.S, Goss C. H. *A story of success: continuous quality improvement in cystic fibrosis care in the USA*. *Thorax* 2011; 66: 1106-1108
- (10) Donabedian AJ. 1979 Aug; 9(2):277-84. *The quality of medical care: a concept in search of a definition*.
- (11) *Fam Pract* 1979;9:277-284.
- (12) Donabedian A. *The Quality of Care How Can It Be Assessed?* *JAMA* 1988;260:1743-1748.
- (13) Orenstein DM Nixon PA, Ross EA, et al. *The Quality of Well-being in Cystic Fibrosis* *Chest* 1989; 95: 344-347.
- (14) <http://www.hhs.gov/>
- (15) Campbell SM, Roland MO, Buetow SA *Defining quality of care* *Soc Sci Med*. 2000; 5 : 1611–1625.
- (16) Batalden PB, Davidoff F. *What is “quality improvement” and how can it transform healthcare?* *Qual Saf Health Care* 2007; 16: 2–3.
- (17) Shaw CD, Kalo I. *A background for national quality policies in health systems*. World Health Organization –2002.
- (18) Sabadosa KA, Batalden PB *The interdependent roles of patients, families and professionals in cystic fibrosis: a system for the coproduction of healthcare and its improvement*. *BMJ Qual Saf* 2014; 23: i90–i94.
- (19) Steinkamp G, Stahl K, Ellemunter H, et al. *Cystic fibrosis (CF) care through the patients' eyes: A nationwide survey on experience and satisfaction with services using a disease-specific questionnaire* *Respir Med*. 2015; 109: 79-87.
- (20) Johnson C, Butler SM, Konstan MW et al. *Factors Influencing Outcomes in Cystic Fibrosis. A Center-Based Analysis* *Chest* 2003; 123: 20–27.
- (21) Ayers LR, et al. *Quality Improvement Learning Collaboratives*. *Qual Manag Health Care* 2005; 14: 234–247.
- (22) Schechter MS *Benchmarking to improve the quality of cystic fibrosis care*. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18: 596–601.
- (23) Speroff T, O'Connor GT *Study Designs for PDSA Quality* *Q Manage Health Care* 2004; 13: 17–32.
- (24) Project no: LSHM-CT-2005-018932EuroCareCFEuropean Coordination Action for Research in Cystic Fibrosis Publishable Final Activity Report.
- (25) <https://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/>
- (26) Cystic Fibrosis Europe. <http://www.cf-europe.eu/who-we-are>
- (27) Peters T. American Society for Quality/Federation of Indian Chambers of Commerce New Delhi 2009.

Giovanna Pisi<sup>1</sup>;  
Valentina Fainardi<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Struttura Semplice Fibrosi  
Cistica, Clinica Pediatrica, Azienda  
Ospedaliera Universitaria di Parma  
<sup>2</sup>Dipartimento Medicina Clinica e  
Sperimentale, Università di Parma

Corrispondenza: Giovanna Pisi  
email: gpisi@ao.pr.it

## Valutazione del danno polmonare nella fibrosi cistica: aggiornamento per tutte le età

*Assessment of pulmonary impairment in cystic fibrosis*

*From childhood to young adults*

**Riassunto** Date l'eterogeneità e la complessità del danno polmonare nella Fibrosi Cistica, la valutazione della funzione respiratoria prevede l'impiego di numerosi e diversi parametri funzionali a seconda della gravità e dell'età del paziente. Il parametro più diffuso e più noto è il volume espiratorio forzato nel 1° sec. (FEV<sub>1</sub>), anche se non sembra in grado di evidenziare alterazioni della funzione respiratoria in fase precoce.

Scopo di questa revisione è la valutazione di indici più sensibili come il *Lung Clearance Index* (LCI), ottenibile anche nel bambino non collaborante. Inoltre è stato esaminato il significato del test di cammino di 6 minuti (6MWT), una metodica molto semplice e riproducibile per indagare la tolleranza allo sforzo del paziente con Fibrosi Cistica durante le normali attività quotidiane.

**Parole chiave:** Fibrosi Cistica, danno polmonare, funzione respiratoria, volume espiratorio forzato nel 1° secondo, capacità di esercizio, test del cammino di 6 minuti.

**Key words:** Cystic Fibrosis, pulmonary disease, lung function, forced expiratory volume in 1 second, exercise tolerance, six minute walking test.

### INTRODUZIONE

Negli ultimi 20-30 anni la storia naturale della Fibrosi Cistica (FC) ha subito un drastico cambiamento, passando da malattia acuta dell'età pediatrica a malattia cronica dell'adulto, tanto che oggi oltre la metà dei pazienti affetti da FC ha più di 18 anni ed è in grado di vivere per molti anni, nonostante una grave compromissione polmonare e una riduzione della funzione respiratoria (1). Uno degli aspetti che caratterizzano il coinvolgimento polmonare della FC è la marcata eterogeneità in termini sia di effetti sul polmone sia di progressione della malattia.

Tale eterogeneità si manifesta in soggetti con lo stesso genotipo e addirittura nello stesso paziente con lesioni differenti a seconda della zona polmonare considerata.

Il difetto primario nella FC consiste in una alterata funzione del canale ionico transepiteliale noto come *CF transmembrane conductance regulator* (CFTR), che si esprime in alterato trasporto di elettroliti e acqua attraverso l'epitelio delle vie aeree e in disidratazione del muco che le riveste. A causa di questa scarsa idratazione delle secrezioni, la *clearance* muco-ciliare è ridotta con conseguente ristagno di muco, che precocemente porta all'ostruzione delle vie aeree e ad una infezione polmonare cronica. Nelle vie aeree ostruite da secrezioni purulente si stabilisce così un

circolo vizioso di infezione e infiammazione che porta ad una progressiva distruzione delle pareti bronchiali con formazione di bronchiectasie diffuse (2).

Nella FC i polmoni sono istologicamente normali alla nascita. Tuttavia le piccole vie aeree, che sono di per sé particolarmente suscettibili a *noxae* infettive ed infiammatorie e anche il sito dove CFTR trova la massima espressione, vanno incontro ad una ostruzione in fasi molto precoci della malattia (3).

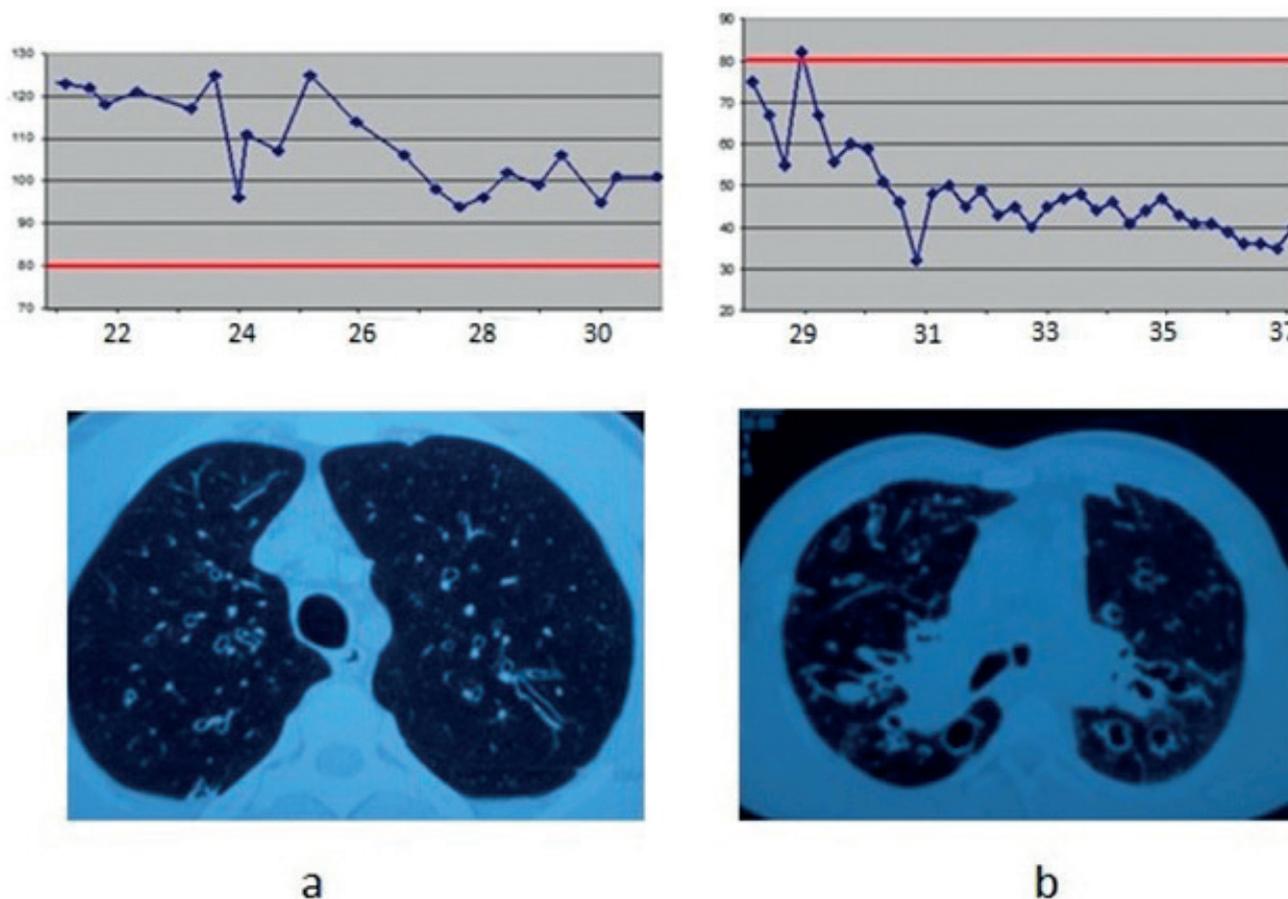
Gli alveoli sono invece relativamente conservati. Nelle fasi terminali della malattia, le bronchiectasie sono un reperto costante e sono localizzate soprattutto ai lobi superiori.

Sebbene la compromissione polmonare sia molto variegata, il quadro funzionale prevalente nella FC è un danno disventilatorio di tipo ostruttivo. Volumi polmonari e compliance tendono ad essere ridotti con aumento delle resistenze delle vie aeree.

Una eterogeneità della ventilazione è una caratteristica del bambino con FC in fase precoce.

Già nel 1969 Phelan e coll (4) avevano dimostrato che lattanti con FC con ileo da meconio apparentemente asintomatici dal punto di vista respiratorio ad 1 mese di vita avevano un intrappolamento di aria. In seguito nel 1978 Godfrey e coll evidenziarono che ostruzione bronchiale e iperinflazione polmonare erano presenti fin dai

**Fig. 1:** Pannello superiore: in asse y FEV<sub>1</sub> (% pred.), in asse x età (anni) in due pazienti FC, FG, 30 anni con malattia lieve (a) e PG, 37 anni con malattia grave (b). La linea rossa indica il limite di normalità. Pannello inferiore: sezione trasversa di tomografia computerizzata ad alta risoluzione polmonare negli stessi pazienti (Dati personali).



primi 5 anni di vita anche senza segni evidenti di malattia polmonare (5). Gli scambi gassosi invece nel paziente FC sono generalmente conservati fino a fasi avanzate di malattia.

Scopo della presente revisione è quello di esaminare il ruolo dei principali test di funzionalità respiratoria nella valutazione del danno polmonare della FC.

Nel paziente FC adulto e nel bambino collaborante la spirometria è ancora il metodo più diffuso per valutare la gravità della malattia polmonare e per monitorarne la progressione (6).

Poiché i lattanti ed i bambini non collaboranti non sono in grado di svolgere manovre di espirazione forzata, la curva espiratoria flusso volume forzata può essere ottenuta sostituendo lo sforzo volontario con l'applicazione di una pressione esterna sul torace e sull'addome mediante una giacchetta gonfiabile (7). Recentemente la determinazione del *lung clearance index* (LCI) mediante *washout* dell'azoto a respiro multiplo sembra essere un indice sensibile di danno polmonare precoce (8) e può essere applicata anche nel bambino piccolo non collaborante, così come la valutazione delle resistenze respiratorie mediante tecnica dell'oscillazione forzata (FOT). Entrambi le metodiche tuttavia non sono ancora largamente impiegate nella pratica clinica, ma soprattutto in ambito di ricerca data la complessità di interpretazione.

La valutazione della tolleranza all'esercizio fisico mediante test del cammino di 6 minuti (*6 Minute Walking Test*, 6MWT) fornisce importanti informazioni prognostiche e viene ampiamente usata soprattutto nei pazienti adulti (9).

### LA SPIROMETRIA

Il volume espiratorio forzato nel 1° sec. (*forced expiratory volume*, FEV<sub>1</sub>), espresso come percentuale del valore predetto, è la principale misura di esito indicata per valutare e monitorare il danno polmonare nel bambino collaborante e nell'adulto con FC. Dal punto di vista clinico infatti il FEV<sub>1</sub> è correlato con la frequenza delle esacerbazioni polmonari e sembra essere il miglior parametro per predire la sopravvivenza (10).

Inoltre la classificazione di gravità della malattia polmonare nella FC si basa sul FEV<sub>1</sub>: lieve, tra 80 e 60%, moderata, tra 40 e 60% e severa, inferiore a 40% (11).

Nella pratica clinica quotidiana un calo del FEV<sub>1</sub> superiore al 10% definisce, in associazione ai sintomi clinici, una riacutizzazione respiratoria.

Nel paziente adulto con danno parenchimale lieve alla Tomografia computerizzata (TC), il FEV<sub>1</sub> può essere normale (fig. 1a), mentre nella fase avanzata di malattia polmonare il FEV<sub>1</sub> riflette l'entità del processo distruttivo polmo-

nare (fig.1b). Nel paziente con malattia polmonare di grado severo la riduzione del FEV<sub>1</sub> si è dimostrata correlata ad una riduzione della PaO<sub>2</sub>, ad un aumento della PaCO<sub>2</sub> e ad una riduzione della compliance polmonare.

Inoltre il FEV<sub>1</sub> è un parametro cardine per la decisione di inviare un paziente al trapianto polmonare (12). I flussi espiratori forzati a basso volume polmonare misurati in riferimento alla capacità vitale forzata (FVC) come il flusso espiratorio forzato al 75% della FVC (FEF<sub>75</sub>), il flusso espiratorio forzato al 50% della FVC (FEF<sub>50</sub>), o il flusso espiratorio forzato tra il 25% ed il 75% della FVC (FEF<sub>25-75</sub>) sono considerati più sensibili ma più variabili del FEV<sub>1</sub> nell'individuare una ostruzione delle piccole vie aeree.

La spirometria è stata impiegata, anche se in studi limitati, in bambini in età prescolare, considerati tradizionalmente "silenti" in termini di misura della funzione polmonare. Marostica *et al.* hanno dimostrato una riduzione significativa dei parametri espiratori forzati in bambini con FC tra i 3 e i 6 anni (13). Analogamente Vilozni *et al.* hanno riportato in 93 bambini con FC tra i 2.5 e i 9 anni una riduzione di FVC, FEV<sub>1</sub>, volume espiratorio forzato a 0,5s (FEV<sub>0.5</sub>) e FEF<sub>25-75</sub> rispetto ai controlli sani (14). Un vantaggio della spirometria nei bambini in età prescolare in grado di compiere una manovra riproducibile di espirazione forzata è quello di avere una traccia longitudinale della funzione polmonare per tutto l'arco della vita.

Tuttavia, come dimostrato da Aurora *et al.* (15), la spirometria potrebbe non essere il test funzionale più sensibile in questa fascia di giovane età. Nonostante il FEV<sub>1</sub> rappresenti un parametro centrale per la valutazione della funzionalità respiratoria nella FC, è necessario infatti considerare alcuni limiti. Innanzitutto il FEV<sub>1</sub> è espressione della pervietà delle vie aeree prossimali, mentre la malattia polmonare della FC comincia dalle piccole vie aeree (al di sotto dei 2 mm di diametro) che contribuiscono solo a circa il 10% delle resistenze totali.

Vari studi hanno dimostrato che la spirometria non è in grado di individuare alterazioni strutturali precoci. Al contrario, studi basati sulla TC hanno dimostrato che alterazioni strutturali possono essere già presenti in lattanti completamente asintomatici e progredire in bambini con spirometria normale.

Pur tenendo conto di questi limiti, il FEV<sub>1</sub> al momento attuale è il solo parametro di funzionalità respiratoria ad essere riconosciuto come misura di esito primario dall'*European Medicines Agency* nei trials clinici in pazienti con FC.

## RVRTC

Sono state sviluppate due metodiche basate sulla compressione rapida toraco-addominale (*Rapid Thoracoabdominal Compression*, RTC); la prima tecnica, si esegue durante il respiro tranquillo a volume corrente (*tidal RTC*), la seconda viene eseguita partendo da un volume polmonare superiore al volume corrente ottenuto mediante una manovra di insufflazione

polmonare applicata prima della manovra di compressione (*Raised Volume RTC*, RVRTC) mentre il lattante è addormentato. Flussi e volumi forzati ottenuti con la tecnica della RVRTC sembrano essere più sensibili nell'evidenziare una riduzione della funzionalità respiratoria in lattanti con FC rispetto alla tecnica eseguita a volume corrente (7).

Dalla migliore curva si possono ottenere i seguenti parametri: FEV<sub>0.5</sub>, FVC, FEF<sub>75</sub> e FEF<sub>25-75</sub>. L'*Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis* inizialmente aveva descritto normali valori di FEV<sub>0.5</sub> in lattanti con FC diagnosticati per screening neonatale nei primi 6 mesi di vita (16).

In uno studio più recente invece lo stesso gruppo ha trovato una significativa riduzione della funzione respiratoria (FVC e FEV<sub>0.5</sub>), correlata alla presenza di una infiammazione neutrofila e all'infezione da *Staphylococcus aureus* o da *Pseudomonas aeruginosa* (17).

Più recentemente, dati del gruppo *London Cystic Fibrosis Collaboration*, hanno dimostrato che, sebbene il 35% dei lattanti con FC a 3 mesi abbia un'alterazione della funzione polmonare (18), durante il 1° anno di vita non si verifica un ulteriore peggioramento, ma addirittura vi è un miglioramento del FEV<sub>0.5</sub> (19).

## WASHOUT A RESPIRO MULTIPLO (MULTIPLE BREATH WASHOUT, MBW)

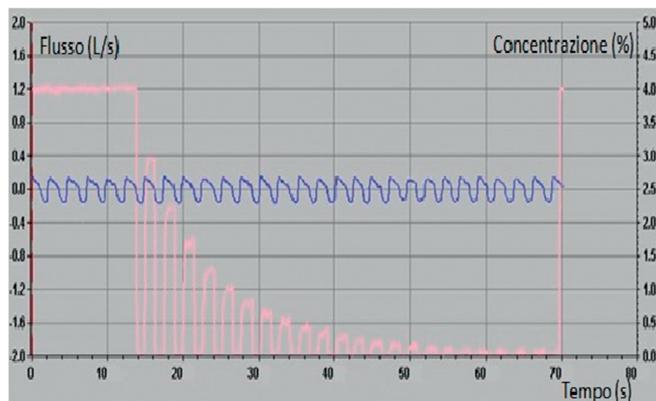
Il test del *washout* polmonare di un gas inerte con tecnica del respiro multiplo (*Multiple Breath Washout*, MBW), descritto per la prima volta oltre 50 anni fa, e riscoperto recentemente, valuta l'efficienza del processo di distribuzione dei gas seguendo l'espirazione dal polmone di un tracciante inerte. MBW è un test che si esegue a respiro corrente, richiede una minima collaborazione e quindi è potenzialmente eseguibile ad ogni età, a partire dalla prima infanzia fino all'età adulta. La determinazione del MBW nel lattante viene eseguita in posizione supina durante il sonno, mentre nel bambino più grande e nell'adulto in posizione seduta mentre il soggetto guarda un video per favorire un pattern respiratorio regolare.

Il MBW fornisce una misura della inomogeneità della ventilazione, espressa da un aumento del tempo necessario per "lavare" dal polmone un gas tracciante inerte come l'esaffluoruro di zolfo, l'elio o l'Argon oppure l'azoto durante il respiro a volume corrente (fig. 2). Il metodo standard per il MBW test prevede l'uso di uno spettrometro di massa in combinazione con un flussimetro oppure, di recente in commercio, di un trasduttore ad ultrasuoni.

Nel soggetto con FC l'inomogeneità della ventilazione è un fenomeno precoce, evidenziabile già nel bambino molto piccolo e asintomatico, per poi diventare molto marcato nell'adulto.

LCI è il parametro più frequentemente usato per esprimere una inomogeneità della ventilazione e misura il numero di volte che il volume polmonare deve essere ricambiato per "lavare" il gas tracciante dal polmone. In presenza di una

**Fig. 2:** Grafico di una manovra di washout in un soggetto sano. La traccia superiore (in blu) rappresenta il flusso (L/sec), con la scala di misura sull'asse y a sin. La traccia inferiore (in rosa) rappresenta la concentrazione del gas tracciante (%), con la scala sull'asse y a dx. Ad ogni respiro vi è in calo nel picco di concentrazione del gas. Sull'asse x è riportato il tempo in sec.



inomogeneità della ventilazione LCI aumenta. Poiché LCI sembra essere un indice sensibile ad alterazioni a livello di vie aeree periferiche, questa caratteristica lo rende particolarmente utile per lo studio della funzione polmonare nella FC in fase precoce di malattia, quando la spirometria è ancora normale.

Nel lattante con FC, LCI sembra avere una sensibilità sovrapponibile a quella dei flussi espiratori massimali nell'evidenziare un danno polmonare iniziale (20).

Inoltre dati recenti suggeriscono che, nel lattante con FC, LCI può essere un marker di inomogeneità della ventilazione indotta dall'infezione da *P. aeruginosa*.

In età prescolare LCI sembra essere ancora più sensibile rispetto ad altri indici funzionali nell'evidenziare alterazioni strutturali precoci visibili alla TC (21).

Nello studio di Aurora *et al* (15) LCI è risultato alterato nel 73% dei bambini FC in età prescolare rispetto al 13% con riduzione della spirometria. Inoltre dati recenti longitudinali suggeriscono che l'alterazione di LCI evidenziata in epoca prescolare può essere predittiva di una alterazione della spirometria in età scolare (22). Nel bambino con FC in età scolare confrontando LCI e HRCT (*High resolution computerized tomography*) è stato dimostrato che se LCI è alterato anche HRCT sarà sempre patologica, mentre un risultato normale nell'una o nell'altra indagine non è predittiva di una normalità nell'altra.

Per ridurre il rischio di esposizione a radiazioni, gli autori suggeriscono che nella pratica clinica LCI dovrebbe essere eseguito come prima indagine e solo se normale il bambino dovrebbe essere sottoposto ad HRCT (23). Nell'adulto con FC con malattia polmonare avanzata esiste una marcata eterogeneità della ventilazione secondaria all'estensione delle bronchiectasie e dei tappi di muco alle vie aeree di grosso calibro, che rende la distribuzione dei gas eccessivamente prolungata.

Pertanto, da un punto di vista pratico, la valutazione di LCI nel paziente adulto non offre sostanziali vantaggi in presenza di malattia polmonare severa e andrebbe riservata ai pazienti in fase lieve-moderata ( $FEV_1 > 60\%$ ).

Poiché LCI si è dimostrato una buona misura di risultato nei trials clinici in cui sono stati valutati interventi terapeutici (salina ipertonica, *dornase alfa*) sulla *clearance* muco-ciliare, è stato recentemente proposto come misura di esito anche per futuri studi sulla terapia genetica in pazienti FC.

### TECNICA DELL'OSCILLAZIONE FORZATA (FORCED OSCILLATION TECHNIQUE, FOT)

La FOT misura le variazioni di flusso e pressione in risposta ad una onda pressoria oscillatoria con frequenze comprese tra 5 e 35 Hz applicata alla bocca durante il respiro corrente.

Una variante di questa metodica è l'oscillometria ad impulsi (IOS) commercializzata nel 1995.

Il riflesso di queste oscillazioni pressorie misurato alla bocca esprime l'impedenza (Z) del sistema respiratorio, in cui si possono distinguere due componenti: la resistenza (Rrs) e la reattanza (Xrs). La misura di Rrs è dominata principalmente dalla resistenza delle vie aeree di conduzione, mentre la componente Xrs misura le proprietà elastiche ed inerziali del sistema respiratorio.

Le basse frequenze (<5 Hz) valutano le proprietà meccaniche del polmone e la pervietà delle piccole vie aeree.

Poiché la FOT può essere eseguita a respiro tranquillo nel bambino in età prescolare, anche nel paziente FC la maggior parte degli studi riguarda popolazioni pediatriche.

Dopo primi studi abbastanza deludenti, successivamente con l'uso delle basse frequenze (0,5-20 Hz) Gangell *et al.* hanno dimostrato che in un gruppo di bambini con FC di età compresa tra 2 e 7 anni che vi è una correlazione tra alterazioni della resistenza e della reattanza e sintomi respiratori (24). Lo stesso gruppo ha evidenziato in bambini FC in età prescolare una correlazione tra resistenza, infezione da *Pseudomonas* e indici di infiammazione neutrofila nel lavaggio broncoalveolare.

Inoltre in una coorte di bambini in età scolare, Ren *et al.* (25) hanno dimostrato una correlazione tra  $R_5$  e  $X_5$  e miglioramento della spirometria dopo trattamento di una esacerbazione respiratoria.

Al momento mancano studi di valutazione della FOT nell'adulto con FC.

### 6MWT

La riduzione della capacità di esercizio è frequente nella FC e dipende da fattori molteplici. Nei pazienti FC con malattia polmonare severa il più importante è il deficit ventilatorio. Il riscontro di una soglia anaerobica precoce e di aumentati livelli di lattato nei pazienti FC con malattia lieve fa ipotizzare che un aumento del metabolismo anaerobio possa essere

una causa principale di limitazione dell'esercizio (26). Fattori aggiuntivi sono la malnutrizione e la ridotta attività.

Negli ultimi 20 anni il 6MWT è stato ampiamente utilizzato per valutare la capacità di esercizio nei pazienti con FC. In particolare, la distanza percorsa è considerata un parametro importante per candidare un paziente al trapianto polmonare e per valutare gli effetti positivi del trapianto sulla tolleranza all'esercizio. Inoltre la distanza percorsa è altamente riproducibile e appare correlata al massimo consumo di ossigeno misurato mediante il test da sforzo massimale con cicloergometro. Quindi il 6MWT è stato proposto come un test semplice, poco costoso e affidabile per la periodica valutazione dei programmi di riabilitazione del paziente con FC (27). Inoltre il tipo di esercizio eseguito durante il 6MWT sembra meglio rispecchiare le normali attività fisiche della vita quotidiana rispetto ad altri tipi di test da sforzo come il cicloergometro o il tappeto scorrevole. In particolare è stato dimostrato che in pazienti adulti con FC con malattia polmonare di grado lieve-moderato la distanza percorsa e la risposta cardiaca sono normali nonostante si verifichi un significativo calo della saturazione arteriosa di ossigeno e un aumento della dispnea durante l'esercizio (9). Il 6MWT potrebbe quindi essere utile per identificare i pazienti che andranno incontro a desaturazione e dispnea durante le normali attività quotidiane.

## CONCLUSIONI

Le diverse metodiche descritte per valutare il danno polmonare nella FC hanno ciascuna i propri vantaggi e limiti; non esiste quindi un test che sia superiore agli altri applicabile in ogni età e fase della malattia.

La spirometria con il FEV<sub>1</sub> rimane un parametro fondamentale nella valutazione respiratoria dell'adolescente e dell'adulto con malattia polmonare avanzata.

Nel lattante la tecnica del RVRTC permette di evidenziare una riduzione della funzione respiratoria in fase molto precoce; tuttavia si tratta di una metodica complessa da eseguire con il bambino sedato.

La recente riscoperta dell'LCI è legata alla sua capacità di essere un parametro molto sensibile in fase precoce di danno polmonare, ottenibile anche nel paziente non in grado di collaborare. Per queste caratteristiche LCI potrà essere utilizzato ampiamente e dare informazioni utili soprattutto in campo pediatrico. Anche la FOT può essere applicata nel bambino non collaborante ed è un test di facile esecuzione e poco costoso; tuttavia saranno necessari ulteriori studi per chiarire il suo ruolo nella valutazione del danno polmonare del paziente FC.

Il 6MWT è un test ampiamente usato e riproducibile nella valutazione respiratoria dell'adulto con FC e fornisce utili informazioni sulla tolleranza allo sforzo del paziente durante le normali attività quotidiane.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) George PM, Banya W, Pareek N, et al. *Improved survival at low lung function in Cystic Fibrosis: cohort study from 1990 to 2007*. *BMJ* 2011; 342: d1008.
- (2) Boucher RC. *Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy*. *Annu Rev Med* 2007; 58: 157-170.
- (3) Brownlee K. *Small airways disease in cystic fibrosis*. *Eur Respir Monogr* 2006; 35: 21-37.
- (4) Phelan PD, Gracey M, Williams HE et al. *Ventilatory function in infant with Cystic Fibrosis. Physiological assessment of halation therapy*. *Arch Dis Child* 1969; 44: 393-400.
- (5) Godfrey S, Mearns M, Howlett G. *Serial lung function studies in Cystic Fibrosis in the first 5 years of life*. *Arch Dis Child* 1978; 53: 83-85.
- (6) CF Trust. *Standards for the Clinical Care of Children and Adult with Cystic Fibrosis in the UK*. London: December 2011.
- (7) Turner DJ, Lanteri CJ, LeSouef PN, et al. *Improved detection of abnormal respiratory function using forced expiration from raised lung volume in infants with Cystic Fibrosis*. *Eur Respir J* 1994; 7: 1995-1999.
- (8) Horsley A. *Lung clearance index in the assessment of airways disease*. *Respir Med* 2009; 103: 793-799.
- (9) Chetta A., Pisi G, Zanini A, et al. *Six-minute walking test in Cystic Fibrosis adults with mild to moderate lung disease: comparison to healthy subjects*. *Respir Med*, 2001; 95: 986-991.
- (10) Kerem E, Reisman J, Corey M, et al. *Prediction of mortality in patients with Cystic Fibrosis*. *N Engl J Med*. 1992; 326: 1187-1191.
- (11) CF-Trust. *Standards of care and good clinical practice for the physiotherapy management of cystic fibrosis; 2011*
- (12) Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, et al. *International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update—a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation*. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 745-755.
- (13) Marostica PJC, Weist AD, Eigen H, et al. *Spirometry in 3- to 6-year-old children with Cystic Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 67-71.
- (14) Vilozni D, Bentur L, Efrati O, et al. *Spirometry in early childhood in Cystic Fibrosis patients*. *Chest* 2007; 131: 356-361.
- (15) Aurora P, Bush A, Gustafsson P, et al. *Multiple-breath washout as a marker of lung disease in preschool children with Cystic Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 249-256.
- (16) Linnane BM, Hall GL, Nolan G, et al. *Lung function in infants with Cystic Fibrosis diagnosed by newborn screening*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 1238-1244.
- (17) Pillarisetti N, Williamson E, Linnane B, et al. *Infection, inflammation and lung function decline in infants with Cystic Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 75-81.
- (18) Hoo AF, Thia LP, Nguyen TT, et al. *Lung function is abnormal in 3-month-old infants with Cystic Fibrosis diagnosed by newborn screening*. *Thorax* 2012; 67: 874-881.
- (19) Nguyen TD, Thia LP, Hoo AF, et al. *Evolution of lung function during the first year of life in newborn screened Cystic Fibrosis infants*. *Thorax* 2012; 69: 910-917.
- (20) Lum S, Gustafsson P, Ljungberg H, et al. *Early detection of Cystic Fibrosis lung disease: multiple-breath washout versus raised volume tests*. *Thorax* 2007; 62: 341-347.
- (21) Gustafsson PM, De Jong PA, Tiddens HA, et al. *Multiple-breath inert gas washou and spirometry versus structural lung disease in Cystic Fibrosis*. *Thorax* 2008; 63: 129-134.
- (22) Aurora P, Stanojevic S, Wade A, et al. *Lung clearance index at 4 years predicts subsequent lung function in children with Cystic Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 752-758.
- (23) Owens CM, Aurora P, Stanojevic S, et al. *Lung clearance index and HRCT are complementary markers of lung abnormalities in young children with CF*. *Thorax* 2011; 66: 481-488.
- (24) Gangell CL, Horak F Jr, Patterson HJ, et al. *Respiratory impedance in children with Cystic Fibrosis using forced oscillations in clinic*. *Eur Respir J* 2007; 30: 892-897.
- (25) Ren CL, Brucker JL, Rovitelli AK, et al. *Changes in lung function measured by spirometry and the forced oscillation technique in Cystic Fibrosis patients undergoing treatment for respiratory tract exacerbation*. *Pediatr. Pulmonol*. 2006; 41: 345-349.
- (26) Moorcroft AJ, Dodd ME, Morris J, et al. *Symptoms, lactate and exercise limitation at peak cycle ergometry in adults with Cystic Fibrosis*. *Eur Respir J* 2005; 25: 1050-1056.
- (27) Gulmans VAM, vanVeldhoven NHMJ, deMeer K, et al. *The six-minute walking test in children with Cystic Fibrosis: reliability and validity*. *Pediatr Pulmonol* 1996; 22: 85-89.

Luigi Maiuri<sup>1,2</sup> Daniela De Stefano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Europeo per la Ricerca in Fibrosi Cistica, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara

Corrispondenza: Luigi Maiuri  
email: maiuri.luigi@hsr.it

## FIBROSI CISTICA: UNA MALATTIA DA ALTERAZIONE DELL'AUTOFAGIA

*Cystic fibrosis: a disease with defective autophagy*

**Riassunto** L'autofagia è un meccanismo fisiologico di sopravvivenza che le cellule adottano in risposta a vari tipi di stress. Una alterazione dell'autofagia è presente in molte patologie umane, comprese alcune patologie respiratorie.

La Fibrosi Cistica (FC) è caratterizzata da un difetto di autofagia causato dal sequestro funzionale di Beclin 1, una proteina fondamentale nella formazione degli autofagosomi, dovuto ad una persistente attivazione della Transglutaminasi Tissutale conseguente al difetto di funzione della CFTR. Il ripristino della risposta autofagica rappresenta una nuova opzione terapeutica per consentire il traffico e la stabilizzazione sulla membrana cellulare della proteina codificata dalla più comune mutazione della CFTR, la F508del.

La correzione del difetto di autofagia mediante regolatori di proteostasi, quali la cisteamina, consente di ripristinare una adeguata funzione della F508del-CFTR e di ridurre significativamente l'infiammazione polmonare sia in modelli murini di malattia sia in pazienti FC omozigoti per la mutazione F508del-CFTR.

**Parole chiave:** Fibrosi cistica, F508del-CFTR, autofagia, transglutaminasi tissutale (TG2), regolatori di proteostasi

**Key words:** cystic fibrosis, F508del-CFTR, autophagy, tissue transglutaminase (TG2), proteostasis regulators

### INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC), la più comune malattia genetica della popolazione caucasica a prognosi severa, che colpisce fra 1 su 2500 e 1 su 3500 nati vivi, è causata da mutazioni del gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), che codifica per una proteina che regola il flusso di ioni, quali cloro e bicarbonati, e fluidi a livello della membrana apicale delle cellule epiteliali (1,2). L'alterata funzione di canale ionico della proteina espressa sulla membrana delle cellule secretive determina il fenotipo clinico. Nella sua forma classica, la FC si manifesta con sintomi caratteristici a livello del polmone, del pancreas, dell'apparato gastrointestinale, del fegato e dell'apparato riproduttivo (3). Il decorso della malattia è variabile: alcuni soggetti presentano ileo da meconio alla nascita, sintomi respiratori e prognosi severa, e altri, invece, hanno scarse manifestazioni polmonari e decorso clinico benigno (4).

Sono state ad oggi identificate circa 2000 mutazioni del gene CFTR. Le mutazioni di cui si conosce l'effetto sulle alterazioni strutturali o funzionali della proteina sono state suddivise in classi (da I a V). Le mutazioni di classe I, II e III alterano in maniera consistente la quantità e la funzione della proteina, impedendone la produzione (classe I) o producendo una proteina mol-

to difettosa incapace di un corretto traffico intracellulare (classe II) o con assenza di funzione di canale ionico (classe III), e si associano ad un fenotipo clinico severo. Le mutazioni di classe IV consentono la sintesi di una proteina difettosa ma capace di svolgere, seppure in piccolissima misura, la sua funzione; quelle di classe V determinano la produzione di una certa quota, anche se piccola, di proteina normale (*Tabella I*). La mutazione più diffusa, la F508del, rappresenta il 50% circa delle mutazioni nell'Europa meridionale e l'80-90% nelle popolazioni del Nord-Europa. È una mutazione di classe II e la proteina risultante presenta un difetto di "folding" ed è rapidamente degradata prima di raggiungere la membrana plasmatica. Altre mutazioni presentano una frequenza compresa fra il 2 e il 5%, mentre alcune sono caratteristiche di particolari gruppi etnici.

### DAL GENE ALLA MALATTIA

#### *Stress ossidativo e Transglutaminasi tissutale*

Nonostante la sopravvivenza sia notevolmente migliorata, l'evoluzione della malattia polmonare rappresenta ancora la principale causa di morbidità e mortalità in FC. Pertanto le terapie attuali, come l'antibioticoterapia per via sistemica e per aerosol, sono prevalentemente orientate a prevenire, quando possibile, e a trattare gli effetti se-

**Tab. 1: Classificazione delle mutazioni in Fibrosi Cistica**

Classe I	Difetto di sintesi della proteina CFTR
Classe II	Difetto di maturazione della proteina che non è in grado di raggiungere la membrana cellulare
Classe III	Difetto di regolazione: la proteina raggiunge la membrana, ma non è in grado di rispondere ai segnali di attivazione del canale del cloro
Classe IV	Normale sintesi della proteina CFTR, ma funzione ridotta
Classe V	Ridotta sintesi della proteina CFTR, ma funzione normale

condari alle ripetute infezioni respiratorie acute che caratterizzano i soggetti affetti da FC.

Negli ultimi anni numerosi studi *in vitro* e *in vivo* hanno correlato il deficit funzionale della proteina CFTR alla disregolazione della risposta infiammatoria.

Una infiammazione "costitutiva" caratterizza le vie respiratorie FC anche in assenza di infezioni batteriche. Il difetto funzionale di CFTR determina una condizione di stress ossidativo intracellulare che perturba l'omeostasi delle cellule epiteliali e predispone all'infiammazione (5). Gli aumentati livelli delle Specie Reattive all'Ossigeno (ROS) inducono modifiche post-traslazionali della Transglutaminasi Tissutale (TG2) (6), una proteina multifunzionale e con variegata localizzazione intracellulare che ha capacità di svolgere attività enzimatica di tipo transamidante in presenza di elevati livelli di calcio intracellulare o attività GTPasica o isomerasica a basse concentrazioni di calcio. Gli elevati livelli di ROS inducono aumento di una proteina ligasi (PIASy) che determina una modifica post-traslazionale (SUMOilazione) della TG2, che compete con la sua ubiquitinazione e conseguente degradazione proteasomica.

L'attività della TG2 permane stabilmente elevata e induce *cross-linking* di varie proteine-substrato. Fra queste figurano PPAR $\gamma$ , una molecola con proprietà antiinfiammatorie, e I $\kappa$ B $\alpha$ , il cui *cross-linking* consente la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B con conseguenti marcati effetti pro-infiammatori (6,7). Queste proteine, modificate da TG2, vanno incontro a ubiquitinazione e accumulano in aggregati intracellulari, denominati aggresomi. Gli aggresomi sono stazioni di deposito intracellulare di proteine da avviare a degradazione che, a causa di un sovraccarico del proteasoma, sono sequestrate negli aggresomi e successivamente trasportate ai lisosomi attraverso un meccanismo alternativo di degradazione, l'autofagia (8,9).

Pertanto, l'accumulo di aggresomi suggerisce, oltre ad un eccesso di formazione di proteine aggregate, anche un loro difettivo smaltimento attraverso l'autofagia.

### DIFETTO DI AUTOFAGIA IN FC

Luciani *et al.* hanno fornito la prima dimostrazione che un difetto di autofagia caratterizza le cellule epiteliali FC (10). L'autofagia è un meccanismo di sopravvivenza che le cellule adottano in risposta a vari tipi di stress (8,9). È un processo fondamentale coinvolto nel *turnover* intracellulare di proteine aggregate e di organelli intra-

cellulari danneggiati attraverso il loro sequestro in vescicole a doppia membrana (autofagosomi) e successiva fusione con i lisosomi per la degradazione.

Una alterazione dell'autofagia è stata associata a varie patologie umane, fra cui malattie neurodegenerative, malattie infiammatorie, sindrome metabolica, tumori e invecchiamento (11,12,13). Recentemente, una alterazione dell'autofagia è stata descritta anche in patologie respiratorie quali enfisema, BPCO ed ipertensione polmonare (11,12,13).

La persistente attivazione della TG2 nelle cellule epiteliali FC induce "*cross-linking*" di Beclin 1, proteina cruciale nel processo di autofagia (8).

Il "*cross-linking*" di Beclin 1 spiazza dal reticolo endoplasmico (RE), sede di azione fisiologica, il complesso di proteine fondamentali per l'autofagia che interagiscono con Beclin 1 (Vps34, Vps15, AMBRA1 e ATG14) e lo sequestra in aggresomi (Figura 1A). Ciò porta ad inibizione della formazione degli autofagosomi, vescicole a doppia membrana che servono ad inglobare proteine danneggiate e organelli intracellulari, per poi fondersi con i lisosomi per la degradazione.

Il blocco dell'autofagia induce accumulo di p62/SQSTM1, una proteina legante ubiquitina, che induce un sovraccarico del proteasoma e favorisce la formazione degli aggresomi (10). Inoltre, è stato riportato che l'accumulo di p62 nei macrofagi di pazienti F508del omozigoti compromette la clearance batterica (*Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*), un evento importante nell'evoluzione della malattia polmonare in FC (14).

### RUOLO PATOGENETICO DEL DIFETTO DI AUTOFAGIA IN FC

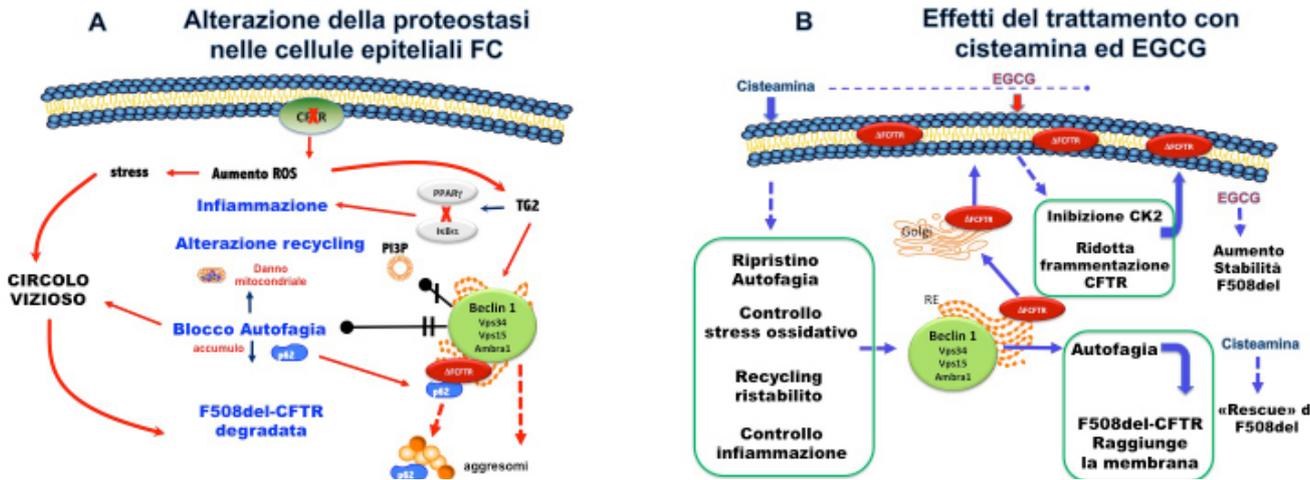
La rilevanza patogenetica di questo meccanismo, schematizzato in Figura 1, è evidenziata dal fatto che, ripristinando i livelli di Beclin 1 sia mediante over-espressione genica sia con molecole che inibiscono l'attività della TG2, quali la cistamina o la sua forma ridotta cisteamina, non solo si ripristina la risposta autofagica, ma si ottiene un efficace controllo della infiammazione polmonare *in vivo* in un modello murino omozigote per la F508del-CFTR.

L'autofagia è un processo fondamentale nel complesso meccanismo di risposta integrata allo stress (8). Il difetto di autofagia determina un circolo patogenetico vizioso che sostiene lo stress ossidativo e l'infiammazione. Dati sperimentali indicano che il ripristino dell'omeostasi cellulare ed il controllo dell'infiammazione conseguenti al trasferimento del gene CFTR *wild-type* in cellule FC sono abrogati se è impedito il concomitante recupero di una appropriata funzione autofagica (15,16). Allo stesso tempo, gli effetti benefici del ripristino dell'autofagia sull'infiammazione polmonare sono abrogati se si inibisce la funzione della CFTR. Queste evidenze sono fortemente suggestive di un ruolo cruciale del ripristino dell'autofagia nel recupero di funzione della CFTR e indicano che la stimolazione dell'autofagia migliora il fenotipo polmonare attraverso il ripristino della funzione della CFTR.

**Fig. 1: L'Autofagia come bersaglio di terapie in FC.**

**A: Il difetto di Autofagia in FC.** La difettiva funzione della CFTR induce un aumento di ROS con conseguente persistenza di elevati livelli di TG2. L'attivazione della TG2 induce cross-linking di Beclin 1, che viene spiazzata dal reticolo endoplasmatico insieme alle proteine con cui interagisce (complesso PI3K III) e sequestrata negli aggresomi. Ciò determina blocco dell'autofagia, aumentati livelli di p62 e accumulo di proteine ubiquitinate in aggresomi. Questo processo sostiene un circolo vizioso che induce ulteriori incrementi di ROS e infiammazione. La F508del-CFTR, in parte degradata attraverso il proteasoma, accumula anche in aggresomi a causa del blocco di autofagia, con sovraccarico del proteasoma, e non può raggiungere il Golgi per essere glicosilata e trasportata in membrana.

**B: Il ripristino della autofagia corregge il difetto funzionale della F508 del-CFTR.** Il trattamento con cisteamina interrompe il circolo vizioso e favorisce una normale risposta autofagica. Conseguentemente, la F508del-CFTR traffica verso la membrana plasmatica ove permane per un periodo anche dopo sospensione del trattamento con cisteamina. L'aggiunta di epigallocatechina gallato inibisce la chinasi CK2, riducendo la frammentazione della CFTR, e aumenta la stabilità della proteina mutata in membrana, prolungando in tal modo gli effetti benefici della cisteamina per un periodo dopo la sua sospensione. A ciò consegue un prolungato controllo dell'infiammazione.



In accordo, dati *in vitro* e *in vivo* in modelli animali indicano che il recupero dei livelli fisiologici di Beclin 1 o il silenziamento genico di p62 non solo ristabiliscono la risposta autofagica, ma ripristinano il traffico intracellulare della F508 del-CFTR verso la membrana plasmatica delle cellule epiteliali respiratorie e la sua funzione (15, 16).

### VECCHIE E NUOVE STRATEGIE PER LA CURA DELLA FC

Le terapie attuali in FC, come le terapie anti-infiammatorie, sono sintomatiche e agiscono a valle del difetto di base della malattia (5). La terapia genica, che dovrebbe essere il *gold standard* per la cura dei pazienti con FC, ha fornito risultati molto insoddisfacenti (17).

La terapia cellulare è ancora in fase di studio e non ci sono al momento risultati che consentano la trasferibilità al paziente. Recentemente, la conoscenza dei meccanismi attraverso cui le mutazioni del gene CFTR conducono alla funzione difettiva della proteina mutata ha aperto la strada alla terapia di riparazione del difetto di base (*CFTR repairing therapy*), che introduce il nuovo concetto di terapie specifiche per le diverse classi di mutazioni. Questa terapia si basa sull'uso di piccole molecole capaci di I) correggere il traffico intracellulare della proteina (correttori) o II) incrementare la funzione della CFTR mutata (potenziatori). La terapia con potenziatori mira ad aumentare la probabilità di apertura del canale ionico della proteina e, quindi, al recu-

pero della funzione di quei mutanti della CFTR capaci di raggiungere la membrana plasmatica delle cellule, ma incapaci di svolgere una normale funzione di canale ionico. Esempio di bersaglio della terapia con potenziatori della CFTR sono le mutazioni di classe III, che presentano un difetto di *gating* della proteina normalmente risiedente in membrana cellulare.

L'uso dei correttori è, al contrario, teoricamente indicato per mutanti con ripiegamento difettivo della proteina (*misfolding*), principalmente mutazioni di classe II, come la F508del, che, a causa del loro difetto conformazionale, rimangono intrappolati nel reticolo endoplasmico nel corso dei processi di *“folding”* e sono degradati dal proteasoma. Un ampio e costoso programma di: *“drug discovery”* in corso con approccio di *“highthroughput screening”*, mira a selezionare, fra milioni di molecole, quelle candidate a divenire potenziatori o correttori della CFTR per il trasferimento alla terapia. Una di queste molecole, il potenziatore VX-770 (Ivacaftor, Kalydeco, Vertex Co.) (18), si è rivelata efficace *in vivo* nel migliorare il trasporto di cloro e la funzione polmonare in pazienti con una rara mutazione di classe III, la G551D, presente in meno del 5% dei pazienti con FC, che codifica per una proteina capace di raggiungere la superficie cellulare ma che presenta un difetto della funzione di canale del cloro. Questa terapia è già disponibile sul mercato, seppure a costi molto elevati, in molti paesi europei ed americani.

Al contrario, i risultati dei *trials* clinici con “correttori” non hanno mostrato alcun beneficio cli-

nico nei pazienti con la più comune mutazione della CFTR, la delezione di fenilalanina in posizione 508 (F508del), presente nel 70% circa dei pazienti FC (2). Questa mutazione di Classe II codifica per una proteina che non riesce a essere completamente ripiegata ed è trattenuta nel RE dove è prematuramente degradata, non riuscendo quindi ad essere trasportata sulla membrana cellulare, sede di attività del canale ionico CFTR. La F508del-CFTR conserva la funzione di canale ionico, sia pur incompleta per un parziale difetto di "gating", quando è trasportata in membrana mediante manipolazioni sperimentali, come l'incubazione a basse temperature, o attraverso l'uso di molecole "chaperons" in grado di accompagnare la proteina attraverso il suo percorso difficoltoso all'interno della cellula. Fra queste molecole, il correttore VX-809 si è rivelato il più efficace nei sistemi *in vitro*, ma i risultati di un *trial* clinico in pazienti omozigoti per la F508del-CFTR sono stati insoddisfacenti (19), anche quando il VX-809 (Lumacaftor) è stato somministrato in associazione al potenziatore VX-770 (Ivacaftor) (20). La scarsa efficacia di questa combinazione terapeutica è motivata da studi recenti (21), che dimostrano come, una volta trasportata in membrana dai correttori, la F508del-CFTR è instabile ed è avviata verso la degradazione lisosomiale.

Questo secondo meccanismo di controllo di qualità non consente alla F508del-CFTR di risiedere in membrana anche dopo trattamento con correttori. Inoltre, recenti evidenze hanno dimostrato che il potenziatore VX-770 compromette la stabilità della F508del-CFTR dopo il suo arrivo in membrana (22). Queste evidenze, sperimentali e cliniche, suggeriscono la necessità di identificare molecole capaci non solo di favorire il traffico della F508del-CFTR verso la superficie cellulare, ma anche di stabilizzarla in membrana per poter ipotizzare un beneficio clinico nei pazienti.

## AUTOFAGIA COME BERSAGLIO DI TERAPIE INNOVATIVE IN FC

### Correggere il difetto della F508del-CFTR senza correttori e/o potenziatori

L'attuale strategia di *drug discovery* mediante "highthroughput screening" (approccio "top-down") si basa sulla ricerca di molecole che interagiscono con la proteina F508del-CFTR favorendone il traffico verso la membrana. Altre strategie, mirano alla ricerca di piccole molecole che modulano le proteine "chaperons" che interagiscono con la CFTR. Un approccio radicalmente diverso pone l'autofagia come bersaglio per la correzione del difetto di base in FC.

Questa strategia differisce dalle terapie con correttori in quanto: I) segue un percorso *bottom-up*, cioè parte dalla conoscenza delle alterazioni di vie di segnale intracellulare conseguenti alla difettiva funzione della CFTR; II) ha come bersaglio diretto non la CFTR mutata ma l'ambiente cellulare in cui questa è costretta a muoversi per raggiungere la membrana, correggendo le alterazioni della "proteostasi" nelle cellule FC.

Studi *in vitro* e *in vivo* in modelli animali, hanno dimostrato che il ripristino dell'autofagia favorisce sia il traffico della F508del-CFTR sia la sua stabilizzazione in membrana, ristabilendo una funzione sufficiente della CFTR senza l'ausilio di correttori o potenziatori della CFTR (10,16). Queste evidenze dimostrano che è sufficiente correggere le alterazioni dell'ambiente intracellulare delle cellule epiteliali FC, conseguenti al deficit di funzione della CFTR, per ripristinare il corretto traffico e la funzione della proteina mutata.

L'identificazione di molecole regolatrici della proteostasi, capaci di ripristinare una corretta autofagia in FC, ha aperto la strada a un percorso di ricerca traslazionale che, partendo da evidenze sperimentali *in vitro* su linee cellulari e *in vivo* su modelli murini di FC, ha condotto ad una sperimentazione clinica su pazienti FC omozigoti per la F508del-CFTR.

La cisteamina, in qualità di regolatore della proteostasi, diversamente dai noti correttori della CFTR precedentemente menzionati, non solo ripristina l'autofagia, ma consente il traffico intracellulare della F508del-CFTR, la stabilizza sulla membrana delle cellule epiteliali per oltre 24 h dopo la sua rimozione e riduce l'infiammazione polmonare dei topi omozigoti per F508del-CFTR anche dopo oltre una settimana di sospensione del trattamento. Infatti, il ripristino della autofagia riduce i livelli di p62 ed il conseguente avvio della CFTR alla degradazione lisosomiale e ripristina il "recycling" delle proteine di membrana, fra cui la CFTR.

Pertanto, la presenza della CFTR funzionante in membrana interrompe il circolo vizioso che porta all'autofagia e all'infiammazione (Figura 1B), e sostiene per un periodo dopo la sospensione del trattamento la sua stessa permanenza in membrana (15,16). La somministrazione orale di cisteamina nei topi F508del-CFTR omozigoti è risultata efficace nel ripristinare la funzione della CFTR, ridurre la mortalità per occlusione intestinale nelle prime settimane di vita dal 50% al 9% circa (23) e ridurre significativamente l'infiammazione polmonare nei topi adulti.

Quest'ultimo effetto della cisteamina si estende per oltre due settimane dopo la sospensione del trattamento, suggerendo che l'identificazione di sostanze capaci di prolungare gli effetti benefici della cisteamina dopo sospensione della terapia potrebbe essere di grande utilità per i pazienti e limitare gli eventuali effetti collaterali del farmaco. Studi recenti hanno dimostrato che l'associazione con un flavonoide contenuto nel tè verde, l'epigallocatechin gallato (EGCG), prolunga *in vitro* e *in vivo* gli effetti della cisteamina dopo la sospensione, inibendo la proteina chinasi CK2, maggiore responsabile dei processi di frammentazione della CFTR che favoriscono la sua instabilità (23).

Sebbene l'EGCG da solo non sia efficace come agente di recupero della F508del-CFTR, è in grado di prolungare gli effetti benefici della cisteamina sulle cellule e sui modelli animali (23).

Il trattamento combinato con cisteamina ed EGCG è stato validato e confermato su cellu-

le primarie prelevate mediante *brushing* nasale direttamente dal paziente omozigote per la F508del-CFTR prima del trattamento per valutare l'eventuale responsività alla terapia, nel contesto di una personalizzazione dell'approccio terapeutico (23).

Il prelievo di cellule epiteliali nasali mediante *brushing* è, infatti, una procedura semplice e ben tollerata e l'epitelio nasale rappresenta una finestra appropriata sul polmone in quanto riproduce le caratteristiche fenotipiche delle cellule bronchiali, principale sede di patologia in FC.

#### DAL LABORATORIO AL PAZIENTE

Recentemente, uno studio clinico in aperto di Fase II (23) ha testato gli effetti della combinazione di cisteamina ed EGCG in 10 pazienti con FC omozigoti per la mutazione F508del-CFTR. Entrambe le sostanze hanno già un noto profilo di tollerabilità.

La cisteamina (nome commerciale *Cystagon*) è un farmaco approvato dalla *Food and Drug Administration* per la terapia di pazienti con cistinosi, una rara malattia da accumulo lisosomiale, e l'EGCG (nome commerciale *Epinerve*) è utilizzato come integratore alimentare.

Lo studio clinico ha raggiunto gli obiettivi primari evidenziando un recupero della funzione della CFTR sia a livello respiratorio, valutata

mediante analisi dell'efflusso di cloro in cellule prelevate a fresco da *brushing* nasale prima e dopo trattamento, sia attraverso la misurazione dei livelli di cloro nel sudore, test ancora utilizzato per la diagnosi di FC. Il trattamento ha determinato un aumento dell'efflusso ionico nell'epitelio nasale con valori pari a oltre il 25% dei controlli sani ed una riduzione del cloro nel sudore di oltre il 20% rispetto al valore basale con valori pari o al di sotto di 60 mmol/L in 7 pazienti, e ha indotto una drammatica riduzione dei livelli di citochine pro-infiammatorie, sia a livello nasale sia nell'espettorato dei pazienti.

#### CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

I recenti progressi della ricerca nella terapia della FC indicano che: I) ristabilire l'autofagia attraverso regolatori di proteostasi rappresenta una strategia alternativa promettente, da confermare in studi clinici multicentrici controllati; II) indirizzare la ricerca verso l'identificazione di molecole/farmaci già in uso in altre patologie umane o sostanze presenti in natura, con profilo di sicurezza noto, costituisce un approccio sostenibile in termini di costi e di trasferibilità clinica, sia per il paziente sia per il sistema sanitario; III) individuare appropriati *test* di predittività di efficacia sul singolo paziente può aprire la strada ad un percorso di medicina personalizzata.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Kerem B, Rommens J.M, Buchanan JA, et al. *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. Science 1989; 245: 1073-1080.
- (2) Farrell PM. *The prevalence of cystic fibrosis in the European Union*. J Cyst Fibros 2008; 7: 450-453.
- (3) O'Sullivan BP, Freedman SD. *Cystic fibrosis*. Lancet 2009; 373: 1891-1904.
- (4) Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, et al. *Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations*. Eur J Hum Genet 2009; 17: 51-65.
- (5) Belcher CN, Vij N. *Protein processing and inflammatory signaling in Cystic Fibrosis: challenges and therapeutic strategies*. Curr Mol Med 2010; 10: 82-94.
- (6) Maiuri L, Luciani A, Giardino I, et al. *Tissue transglutaminase activation modulates inflammation in cystic fibrosis via PPARgamma down-regulation*. J Immunol 2008; 180: 7697-7705.
- (7) Luciani A, Vilella V.R, Vasaturo A, et al. *SUMOylation of tissue transglutaminase as link between oxidative stress and inflammation*. J Immunol 2009; 183: 2775-2784.
- (8) Kroemer G, Mariño G, Levine B. *Autophagy and the integrated stress response*. Mol Cell 2010; 40: 280-293.
- (9) Mizushima N, Komatsu M. *Autophagy:renovation of cells and tissues*. Cell 2011; 147: 728-741.
- (10) Luciani A, Vilella VR, Esposito S, et al. *Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition*. Nat Cell Biol 2010; 12: 863-875.
- (11) Wong E, Cuervo AM. *Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases*. Nat Neurosci 2010; 13: 805-811.
- (12) Choi AM, Ryter SW, Levine B. *Autophagy in human health and disease*. N Engl J Med 2013; 368: 651-662.
- (13) Ryter SW, Nakahira K, Haspel JA. *Autophagy in Pulmonary Diseases*. Annu Rev Physiol 2012; 74: 377-401.
- (14) Abdulrahman BA, Khweek AA, Akhter A, et al. *Depletion of the ubiquitin-binding adaptor molecule SQSTM1/p62 from macrophages harboring cfr ΔF508 mutation improves the delivery of Burkholderia cenocepacia to the autophagic machinery*. J Biol Chem 2013; 288: 2049-2058.
- (15) Vilella VR, Esposito S, Bruscia EM, et al. *Disease-relevant proteostasis regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Cell Death Diff 2013; 20: 1101-1015.
- (16) Luciani A, Vilella VR, Esposito S, et al. *Targeting autophagy as a novel strategy for facilitating the therapeutic action of potentiators on ΔF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Autophagy 2012; 8: 1657-1672.
- (17) Amaral MD. *Targeting CFTR: how to treat cystic fibrosis by CFTR-repairing therapies*. Curr Drug Targets 2011; 12: 683-693.
- (18) Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. *A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation*. N Engl J Med 2011; 365: 1663-1672.
- (19) Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, et al. *Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation*. Thorax 2012; 67: 12-18.
- (20) Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, et al. *A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial*. Lancet Respir Med 2014; 7: 527-538.
- (21) Okiyoneda T, Barriere H, Bagdany M, et al. *Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane*. Science 2010; 329: 805-810.
- (22) Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, et al. *Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of ΔF508 CFTR in cystic fibrosis*. Sci Transl Med 2014; 6: 246.
- (23) De Stefano D, Vilella V.R, Esposito S, et al. *Restoration of CFTR function in patients with cystic fibrosis carrying the F508del-CFTR mutation*. Autophagy 2014; 10: 2053-2074.

Silvia Montella<sup>1</sup>, Angela Orabona<sup>2</sup>,  
Laida Lisa di Micco<sup>1</sup>, e Francesca  
Santamaria<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche  
Traslocazionali, Sezione di Pediatria,  
Università Federico II, Napoli

<sup>2</sup> Ufficio Scolastico Regionale per la  
Campania, Napoli

Corrispondenza: Dott.ssa Francesca  
Santamaria  
email: santamar@unina.it

## “Aria buona a scuola”: un’indagine pilota in Campania

“Good air at school”: a pilot study in Campania

**Riassunto** Le malattie respiratorie croniche, tra cui l’asma, sono tra le principali cause di morbosità e mortalità sia nei bambini sia negli adulti, con un elevato impatto socioeconomico. Negli ultimi anni si sta assistendo ad un aumento della loro prevalenza, soprattutto tra i bambini e si ritiene ragionevole attribuire un ruolo importante alle condizioni ambientali e allo stile di vita. L’inquinamento *indoor* è sicuramente uno dei fattori maggiormente implicati nell’induzione di manifestazioni allergiche e del declino della funzionalità respiratoria: pertanto negli ultimi anni la qualità dell’aria negli ambienti confinati è divenuta un problema di sanità pubblica. L’attenzione posta in età pediatrica è giustificata dalla lunga permanenza dei bambini nelle aule scolastiche, da cui deriva una maggiore suscettibilità ai rischi determinati dalle sostanze inquinanti. L’ultima Relazione sullo Stato Sanitario del Paese (2012-2013) ha sottolineato l’importanza dell’informazione dei cittadini e degli operatori di settore e delle misure di prevenzione attuabili per contenere l’inquinamento *indoor*. Campagne di educazione ed informazione rappresentano uno strumento fondamentale per sensibilizzare l’opinione pubblica e gli operatori di settore su questo argomento. Futuri studi longitudinali potranno dimostrare gli effetti a lungo termine dell’esposizione a bassi livelli di inquinanti *indoor*, nonché l’efficacia delle misure di abbattimento nella prevenzione di tali effetti.

**Parole chiave:** inquinamento *indoor*, asma, scuola  
**Key words:** indoor air pollution, asthma, school

Le malattie respiratorie croniche sono tra le principali cause di morbosità, disabilità e mortalità prematura e hanno un elevato impatto socioeconomico. Tra quelle di maggiore interesse in termini di salute pubblica vi è l’asma bronchiale, allergico e non. Nel 2004, a livello internazionale è stata creata la *Global Alliance against chronic Respiratory Diseases* (GARD), ed il Ministero della Salute italiano ha aderito a tale iniziativa creando nel 2009 la GARD italiana (GARD-I).

I dati riportati in questo documento hanno mostrato come negli ultimi decenni vi sia stato un generale incremento di sintomi/malattie respiratorie nella popolazione italiana, con una prevalenza dell’asma bronchiale pari al 6-8% nella popolazione generale e nei giovani adulti, e fino al 9-10% nei bambini (1).

Stando ai dati riportati nella recente relazione sullo Stato Sanitario del nostro Paese (2012-2013), in Italia la prevalenza delle malattie allergiche, cresciuta sensibilmente negli anni ‘90 e duemila, è tornata a decrescere e al momento riguarda il 6.3% dei ragazzi (era pari all’8% nel 2008), mentre la diffusione della bronchite cronica (2.1%), asma bronchiale inclusa, pur risultando in netta diminuzione rispetto all’anno precedente, è sostanzialmente stabile se confrontata con un periodo di tempo più lungo (2). Diverse sono le spiegazioni dell’elevato numero di malati

allergici di tutte le età, e tra queste sembra che sia soprattutto lo stile di vita delle società industrializzate a favorirlo in misura significativa. Peraltro relativamente all’asma vi sono conferme di uno stretto legame con obesità e sedentarietà (3).

### L’INQUINAMENTO INDOOR

L’inquinamento *indoor* è definito come presenza, nell’aria degli ambienti confinati, di inquinanti chimici, fisici o biologici non rilevabili, naturalmente, nell’aria esterna. Gli inquinanti principali sono rappresentati da anidride carbonica, particolato respirabile (PM10), monossido di carbonio, composti organici volatili (COV), ossidi di azoto, ossidi di zolfo e formaldeide. Sono ulteriori esempi di possibili fonti gli allergeni quali gli acari della polvere e i derivati dell’epitelio di animali domestici, il riscaldamento domestico, gli impianti di condizionamento ed umidificazione, ed il fumo di tabacco sia attivo sia passivo (4-7). In particolare, l’esposizione al fumo passivo nel periodo prenatale ed in età neonatale/infantile facilita enormemente il rischio di sensibilizzazione allergica e lo sviluppo di asma nelle epoche successive della vita (4). I bambini asmatici le cui madri sono fumatrici usano più di frequente farmaci antiasmatici, ricorrono più spesso al pronto soccorso rispetto ad

altri ed hanno un rischio di mortalità per malattie respiratorie raddoppiato (5, 6). Circa la metà dei bambini italiani, da 0 a 13 anni, è molto esposta al fumo passivo e la quota maggiore di fumatori passivi risiede nelle regioni dell'Italia meridionale e insulare (2). In particolare, i soggetti esposti a fumo in ambienti confinati presentano un rischio di asma aumentato del 40-60% rispetto ai non esposti.

L'inquinamento *indoor* è preoccupante in età pediatrica perché il bambino trascorre la maggior parte delle ore della sua giornata all'interno delle mura scolastiche ed è pertanto maggiormente suscettibile ai rischi derivati dall'esposizione alle sostanze inquinanti. D'altronde, in età pediatrica le vie aeree presentano un calibro ridotto rispetto agli adulti, per cui più facilmente le sostanze inquinanti vi possono rimanere intrappolate (8). Ciò comporta un considerevole aumento di rischio di costrizione delle vie aeree inferiori, configurandosi di conseguenza il quadro dell'asma bronchiale. Infine, per un apparato respiratorio in fase di sviluppo, l'esposizione agli inquinanti e agli allergeni può condizionare la comparsa o la persistenza dell'asma anche in età adulta (9). Ciò è dovuto anche al fatto che l'asma accelera la fisiologica e progressiva perdita di funzione respiratoria che si verifica negli adulti con l'aumentare dell'età.

Negli edifici scolastici gli inquinanti possono provenire anche dall'ambiente esterno dal momento che l'aria esterna contenente inquinanti atmosferici può immettersi facilmente in case, uffici, classi scolastiche e qualsiasi altro ambiente confinato.

Le principali fonti di inquinamento *indoor* sono: materiali vari usati per le attività didattiche (polvere di gesso, attività artistiche e/o di laboratorio, colle, adesivi e solventi), dispositivi di riscaldamento, attrezzi e suppellettili usati nelle palestre (es. *moquette* e rivestimenti trattati con sostanze chimiche) e prodotti utilizzati per la pulizia degli ambienti e dell'arredo. L'esposizione a muffe e inquinanti *indoor* peggiora sensibilmente nella stagione invernale quando tutti trascorrono più tempo in ambienti in cui l'apertura delle finestre è ridotta. Ciò, unitamente all'aumentata incidenza di infezioni delle vie aeree, giustifica il più frequente ricorso in quel periodo dell'anno ai trattamenti antiasmatici (10). Diversi studi evidenziano non soltanto che la concentrazione di alcuni inquinanti in ambienti confinati è superiore a quella rilevabile all'esterno (*outdoor*), confermando che le fonti d'inquinamento sono anche di origine *indoor*, ma che perfino a basse concentrazioni si possono avere effetti sulla salute, specie per persone particolarmente vulnerabili come i bambini e i soggetti allergici e asmatici (9, 11-15).

Confermata la stretta relazione esistente tra ambiente di vita *indoor* e livello di salute della popolazione, il recente documento italiano ha altresì sottolineato l'importanza dell'approccio preventivo che utilizzi soprattutto l'informazione e la formazione sia dei cittadini sia degli operatori di settore (2). Fortunatamente, la pre-

senza di allergeni e di inquinanti *indoor* è interamente prevedibile e prevenibile, ma nel percorso molti sono i soggetti da coinvolgere in quanto responsabili: istituzioni centrali, governi ed enti locali, e, non ultimi, gli individui stessi, con le loro scelte di prodotti di consumo e di arredo.

## LA PREVENZIONE NELLE SCUOLE

In tema di prevenzione dei rischi per la salute derivanti da fattori ambientali, è solo negli ultimi anni che nel nostro paese si è dedicata maggiore attenzione all'inquinamento scolastico (16). Nell'accordo del 2010 tra Governo, Regioni e Province concernente le linee guida per la prevenzione di allergie ed asma in ambienti scolastici, è stata focalizzata l'attenzione sull'importanza, per la salute dei bambini, delle condizioni di igiene e di qualità dell'aria negli ambienti scolastici (17). Nel documento è stata sottolineata anche l'inadeguatezza del quadro normativo disciplinante molti aspetti dell'edilizia scolastica, della qualità dell'aria *indoor* e del microclima, il quale risulta non aggiornato rispetto alle ultime evidenze scientifiche e non rispondente alle esigenze degli edifici in rapporto al risparmio energetico, ai requisiti bio-climatici e alle caratteristiche di salubrità e sicurezza dei materiali e degli arredi.

I risultati principali di un recente progetto multicentrico europeo sull'inquinamento nelle scuole hanno evidenziato nelle aule di alcune regioni italiane (Piemonte, Lombardia, Emilia-Romagna, Lazio, Sicilia e Sardegna), per gli stessi inquinanti analizzati, concentrazioni *indoor* più alte rispetto a quelle esterne, a conferma del contributo "proprio" di fonti interne nel rilascio di sostanze chimiche, ed inoltre valori di formaldeide più elevati tra tutte le scuole europee indagate (18).

Pertanto, stando alle recenti direttive degli organi di governo, è assolutamente necessario "sviluppare le conoscenze tra gli operatori della salute e dell'ambiente sui temi della integrazione ambiente-salute e della comunicazione del rischio....con la strategia di ridurre attraverso interventi di prevenzione collettiva le esposizioni ai principali inquinanti, con particolare attenzione ai bambini e ai soggetti con malattie croniche, come asma", e soprattutto "sensibilizzare e formare il personale scolastico sulle problematiche correlate alla qualità dell'aria *indoor* e sui sistemi di riduzione/abbattimento dei livelli di inquinanti *indoor*" (19).

## IL PROGETTO "ARIA BUONA A SCUOLA"

Obiettivi principali del progetto Aria Buona a Scuola (ABS) condotto in collaborazione con l'Ufficio Scolastico Regionale per la Campania sono stati:

- 1) informare e sensibilizzare il personale docente e gli operatori scolastici di Istituti di Istruzione Primaria e Secondaria di Primo Grado della Regione Campania sulle cause delle malattie allergico-respiratorie e sulle

- 2) misure di prevenzione ad esse legate; realizzare un percorso formativo per il personale della scuola in merito al corretto uso di attrezzature e di sostanze e materiali impiegati in ambiente scolastico;
- 3) organizzare incontri con gli alunni, in collaborazione con il personale docente e gli operatori scolastici in precedenza formati, con la finalità di informare e discutere sulle cause delle malattie allergico-respiratorie e sulle misure di prevenzione ad esse legate;
- 4) predisporre un'indagine conoscitiva sulle cause delle malattie allergico-respiratorie e sulle misure di prevenzione ad esse legate, somministrando un questionario ad un campione pilota di famiglie degli alunni, di personale docente e di operatori scolastici, ed elaborarne i risultati;
- 5) realizzare, in un sottocampione di aule degli Istituti scolastici coinvolti nel progetto, rilevazioni ambientali mediante campionatori passivi (Radiello®, Sigma-Aldrich, USA) posizionati per sette giorni consecutivi per la determinazione ed il monitoraggio diretto dei livelli *indoor* di COV e di sostanze contenute nel fumo di sigaretta.

Abbiamo realizzato il progetto in 12 scuole distribuite sul territorio della regione Campania,

di cui 6 a Napoli e provincia, 2 a Caserta e provincia, 2 nella provincia di Salerno, 1 nella provincia di Benevento, e 1 nella provincia di Avellino, tutte, tranne una, localizzate in una zona urbanizzata. Nelle 12 scuole partecipanti allo studio sono stati raccolti un totale di 706 questionari sulla conoscenza dell'asma. Di questi, 520 sono stati compilati dai genitori degli alunni e 186 dai docenti e dal personale ATA. I risultati del questionario sono riassunti nella Tabella 1.

In generale, sia i genitori degli alunni sia i docenti ed il personale ATA intervistati mostrano di possedere buone conoscenze sulla malattia asmatica.

In 2 scuole non è stato possibile dosare le concentrazioni ambientali di COV in quanto il campionatore passivo non è stato restituito (un istituto) oppure è stato smontato prima dell'invio in laboratorio (una scuola).

Le concentrazioni di COV rilevate nell'aria di 10 su 12 scuole partecipanti allo studio sono riportate nella Tabella 2. Nessun composto presentava livelli tossici in alcuna scuola, essendo stati rilevati in tutti gli istituti valori decine di volte al di sotto delle soglie ritenute tossiche. Tuttavia, in 3 delle 10 scuole abbiamo trovato concentrazioni di tutti i COV più basse rispetto

**Tab. 1.** Risultati del questionario sulla conoscenza dell'asma compilato dai genitori degli alunni, dai docenti e dal personale ATA.

Domanda		Genitori (n = 520)	Docenti/Personale ATA (n = 186)
L'asma è una malattia contagiosa?	Vero	17 (3.3%)	7 (3.8%)
	Falso	492 (94.6%)	178 (95.7%)
	Non so	11 (2.1%)	1 (0.5%)
Durante un attacco d'asma i bronchi si restringono?	Vero	412 (79.2%)	161 (86.5%)
	Falso	25 (4.8%)	5 (2.7%)
	Non so	83 (16%)	20 (10.7%)
Aria fredda, sforzo e infezioni possono scatenare un attacco d'asma?	Vero	417 (80.2%)	143 (76.9%)
	Falso	49 (9.4%)	24 (12.9%)
	Non so	54 (10.4%)	19 (10.2%)
L'asma può svilupparsi nei bambini e negli adulti?	Vero	503 (96.7%)	181 (97.3%)
	Falso	7 (1.3%)	4 (2.1%)
	Non so	10 (1.9%)	1 (0.5%)
Con l'asma bisogna evitare molte cose (fumo, polveri, prodotti per la pulizia degli ambienti, colle, adesivi)?	Completamente d'accordo	470 (90.4%)	169 (90.1%)
	Parzialmente d'accordo	43 (8.3%)	13 (7%)
	Parzialmente in disaccordo	3 (0.6%)	1 (0.5%)
	Completamente in disaccordo	2 (0.4%)	2 (1.1%)
L'asma peggiora se le persone vicino a te fumano?	Completamente d'accordo	462 (88.8%)	168 (90.3%)
	Parzialmente d'accordo	50 (9.6%)	18 (9.7%)
	Parzialmente in disaccordo	3 (0.6%)	0 (0%)
	Completamente in disaccordo	2 (0.4%)	0 (0%)
Con l'asma non si può fare attività sportiva?	Completamente d'accordo	79 (15.2%)	30 (16.1%)
	Parzialmente d'accordo	147 (28.3%)	41 (22%)
	Parzialmente in disaccordo	103 (19.8%)	35 (18.8%)
	Completamente in disaccordo	167 (32.1%)	71 (38.2%)
Se non si cura l'asma si potrebbero avere peggioramenti in futuro?	Completamente d'accordo	402 (77.3%)	145 (77.9%)
	Parzialmente d'accordo	70 (13.5%)	31 (16.7%)
	Parzialmente in disaccordo	19 (3.6%)	1 (0.5%)
	Completamente in disaccordo	8 (1.5%)	1 (0.5%)

Valori espressi come numero assoluto (%).

alle altre. Inoltre, non è stata rilevata la presenza di acetonitrile, acrilonitrile, metil-metacrilato e naftalene in alcuna scuola.

**Tab. 2.** Concentrazioni di composti organici volatili rilevate mediante campionatore passivo nell'aria di 10 scuole partecipanti allo studio.

Composto	Concentrazione ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
Etanolo	10.6 (3.7-132.0)
Acetone	0.3 (0-1.6)
Isopropanolo	13.8 (2.1-202.0)
Pentano	0.9 (0.4-1.9)
Metil-acetato	1.6 (0.8-6.2)
Ciclopentano	0.3 (0.2-0.8)
Due-metilpentano	0.8 (0.5-2.7)
Metiletil-chetone	0.3 (0-5.3)
Tre-metilpentano	0.6 (0.3-1.9)
Etil-acetato	1.6 (0.7-12.5)
n-esano	0.4 (0.2-5.9)
Isobutanolo	0.4 (0.2-1.9)
Etbe	0.6 (0.4-0.9)
Metil-ciclopentano	0.7 (0.3-6.2)
Butanolo	0.5 (0-2.0)
Benzene	1.0 (0.4-1.9)
Uno-metossi-due-propanolo	1.1 (0-25.7)
Cicloesano	1.6 (0.5-14.8)
AlifaticiC7	7.9 (2.2-30.2)
Metil-cicloesano	22.9 (1.8-110.0)
Toluene	3.2 (1.4-5.0)
Butil-acetato	0.5 (0-0.9)
AlifaticiC8	3.3 (0.5-7.0)
Tetracloroetilene	0.5 (0-1.8)
Etilbenzene	0.5 (0.3-1.2)
m-p-xilene	1.3 (0.8-2.8)
o-xilene	0.4 (0.3-1.0)
Due-butossietanolo	9.5 (0.9-157.0)
AlifaticiC9	0.4 (0.2-1.2)
AromaticiC9	1.6 (1.1-9.1)
Limonene	1.5 (0.3-12.3)

Valori espressi come mediana (range).

Nella Tabella 3 sono sintetizzati i risultati relativi al questionario sulle fonti di COV in 9 delle 10 scuole che hanno effettuato la misurazione nell'aria *indoor* (un istituto non ha compilato il questionario sulle fonti di COV nelle scuole).

A differenza degli altri istituti, le 3 scuole con concentrazioni di tutti i COV più basse rispetto alle altre non utilizzano detersivi e colle che emettono COV, non presentano arredi in formica o lavagna classica con gesso nelle aule, effettuano pulizia quotidiana dei vetri delle finestre ed utilizzano l'aspirapolvere per i pavimenti. Infine, nelle scuole con le più alte concentrazioni di COV le aule sono situate in vicinanza di deposito rifiuti, di sala con fotocopiatrice e/o stampante e di aree dove si fuma.

## CONCLUSIONI

La qualità dell'aria *indoor* è un importante determinante di salute, responsabile in misura notevole del carico globale di inabilità, anche in età pe-

diatrica (20). Per realizzare una valida prevenzione delle malattie respiratorie acute e allergiche nei bambini e per prevenire le frequenti assenze e lo scarso rendimento scolastico è necessario focalizzare l'attenzione sulla qualità dell'ambiente *indoor* nelle scuole.

**Tab. 3.** Risultati relativi al questionario sulle fonti di composti organici volatili (COV) nelle scuole che hanno effettuato la misurazione nell'aria *indoor*.

	Scuole con concentrazioni di COV più basse (n = 3)	Scuole con concentrazioni di COV più alte (n = 6)
Uso di detersivo per pavimenti che emette COV	0%	67%
Uso di detersivo per banchi/piani di lavoro che emette COV	33%	67%
Pulizia di vetri tutti i giorni	100%	17%
Utilizzo dell'aspirapolvere	67%	0%
Uso di colle che emettono COV	33%	83%
Presenza di sedie, banchi e cattedra in formica	33%	67%
Aula in vicinanza di sala con fotocopiatrice e/o stampante	0%	50%
Aula in vicinanza di aree dove si fuma	0%	33%
Aula in vicinanza di deposito di rifiuti	0%	17%
Uso di lavagna classica con gesso	33%	100%

Il fine ultimo non è solo quello di informare, ma anche di sollecitare considerazioni sul sistema di monitoraggio e controllo ambientale e sul loro ruolo potenziale per la tutela della qualità dell'aria *indoor*.

Le linee guida internazionali raccomandano una serie di azioni per prevenire, ridurre o eliminare la presenza di inquinanti *indoor* (21-23), e cioè:

1. migliorare la ventilazione e aumentare il ricambio dell'aria;
2. migliorare i sistemi di pulizia e di igiene;
3. vigilare sul rispetto del divieto di fumo;
4. rimuovere tutte le possibili fonti di COV e di altri inquinanti;
5. tenere sotto controllo l'umidità dell'ambiente per ridurre la carica microbica.

In particolare, il ricambio frequente dell'aria rappresenta un metodo molto efficiente per abbattere le concentrazioni di qualunque sostanza volatile (22). Composti più pesanti, invece, possono essere rimossi efficacemente con l'utilizzo di aspirapolvere dotato di filtro ad alta efficienza, che opera mediante filtrazione meccanica, precipitazione elettrostatica e generazione di

ioni con carica negativa (24). Queste misure preventive, associate al controllo dell'umidità dell'aria ed alla rimozione di tutti gli accessori che accumulano polveri ed inquinanti (tappeti, tende, coperture in tessuto, ecc.), aiutano anche a ridurre i livelli *indoor* di allergeni e di conseguenza a prevenire la comparsa di sintomi allergici (24).

Infine, dovrebbero essere condotte campagne di educazione ed informazione, in quanto

rappresentano uno strumento fondamentale per sensibilizzare l'opinione pubblica e gli operatori coinvolti nel settore scolastico su questo argomento. Futuri studi longitudinali potranno dimostrare gli effetti a lungo termine dell'esposizione a bassi livelli di inquinanti *indoor*, nonché l'efficacia delle suddette misure di abbattimento nella prevenzione di tali effetti.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Alleanza contro le malattie respiratorie croniche –GARD– I. Scaricabile da <http://www.salute.gov.it>. Ultimo accesso: gennaio 2015.
- (2) Relazione sullo Stato Sanitario del Paese 2012-2013. Scaricabile da <http://www.salute.gov.it>. Ultimo accesso: gennaio 2015.
- (3) Lucas S.R, Platts-Mills TA. *Paediatric asthma and obesity*. Paediatr Respir Rev 2006; 7: 233-238.
- (4) Burke H, Leonardi-Bee J, Hashim A, et al. Prenatal and passive smoke exposure and incidence of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. Pediatrics 2012; 129: 735-744.
- (5) Ciaccio CE, Gentile D. Effects of tobacco smoke exposure in childhood on atopic diseases. Curr Allergy Asthma Rep 2013; 13: 687-692.
- (6) Feleszko W, Ruszczyński M, Jaworska J, et al. Environmental tobacco smoke exposure and risk of allergic sensitisation in children: a systematic review and meta-analysis. Arch Dis Child 2014; 99: 985-992.
- (7) Ferrante G, Antona R, Malizia V, et al. Smoke exposure as a risk factor for asthma in childhood: A review of current evidence. Allergy Asthma Proc 2014; 35: 454-456.
- (8) Zeman KL, Bennett WD. Growth of the small airways and alveoli from childhood to the adult lung measured by aerosol-derived airway morphometry. J Appl Physiol (1985) 2006; 100: 965-971.
- (9) Bernstein JA, Alexis N, Bacchus H, et al. The health effects of nonindustrial indoor air pollution. J Allergy Clin Immunol 2008; 121: 585-591.
- (10) Cohen HA, Blau H, Hoshen M, et al. Seasonality of asthma: a retrospective population study. Pediatrics 2014; 133: e 923-932.
- (11) Franklin PJ. Indoor air quality and respiratory health of children. Paediatr Respir Rev 2007; 8: 281-286.
- (12) Hulin M, Simoni M, Viegi G, et al. Respiratory health and indoor air pollutants based on quantitative exposure assessments. Eur Respir J 2012;40:1033-45.
- (13) Viegi G, Simoni M, Scognamiglio A, et al. Indoor air pollution and airway disease. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8: 1401-1415.
- (14) Simoni M, Scognamiglio A, Carrozzi L, et al. Indoor exposures and acute respiratory effects in two general population samples from a rural and an urban area in Italy. J Expo Anal Environ Epidemiol 2004; 14: S1 44-152.
- (15) La Grutta S. Gli inquinanti outdoor e indoor: quali è importante conoscere? Pneumologia Pediatrica 2007;27:4-8
- (16) Qualità dell'aria nelle scuole: un dovere di tutti un diritto dei bambini. Scaricabile da <http://www.isprambiente.gov.it>. Ultimo accesso: gennaio 2015.
- (17) Linee di indirizzo per la prevenzione nelle scuole dei fattori di rischio *indoor* per allergie ed asma. Scaricabile da <http://www.statoregioni.it>. Ultimo accesso: gennaio 2015
- (18) Progetto SEARCH II School Environment and Respiratory Health of Children. Scaricabile da <http://www.isprambiente.gov.it>. Ultimo accesso: gennaio 2015.
- (19) Piano nazionale della prevenzione 2014-2018. Scaricabile da <http://www.statoregioni.it>. Ultimo accesso: gennaio 2015.
- (20) Valent F, Little D, Bertollini R, et al. Burden of disease attributable to selected environmental factors and injury among children and adolescents in Europe. Lancet 2004; 363: 2032-2039.
- (21) World Health Organization. Air quality guidelines for Europe. 2nd ed. European series, No 91. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Publications, 2000.
- (22) American Thoracic Society. Achieving healthy indoor air. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: S 33-64.
- (23) European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients' Association (EFA). Towards healthy air in dwellings in Europe, 2004. Brussels, Belgium: EFA, 2004. [www.efanet.org](http://www.efanet.org).
- (24) Samet J M, Marbury M C, Spengler J D. Health effects and sources of indoor air pollution. Part II. Am Rev Respir Dis 1988; 137: 221-42.
- (25) Liccardi G, D'Amato G. Indoor prevention of respiratory allergy. In: D'Amato G, Holgate S T, eds. The impact of air pollution on respiratory health. Eur Respir Mon 2002; 7 (Monograph 21): 226-40.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il dr Paolo Sacco, Clinica del Lavoro e della Riabilitazione, Fondazione Salvatore Maugeri (Pavia) per la determinazione dei livelli indoor dei composti organici volatili, e la dr.ssa Marianna Ciano per la collaborazione nella raccolta dei dati. Lo studio ABS non sarebbe stato realizzato senza il contributo della Direzione Generale dell'Ufficio Scolastico Regionale per la Campania e la partecipazione dei genitori degli alunni, dei Dirigenti Scolastici e del personale docente ed ATA delle seguenti istituzioni scolastiche:

- Istituto Comprensivo Giampietro Romano, Torre Del Greco (Napoli);
- 1° Circolo Didattico, Vico Equense (Napoli);
- 3° Circolo Didattico, Caserta;
- 2° Circolo Didattico, Angri (Salerno);
- Istituto Comprensivo Falcetti, Apice (Benevento);
- Istituto Comprensivo, Darmon Marano (Napoli);
- Istituto Comprensivo Quasimodo, Crispano (Napoli);
- Scuola Secondaria 1° grado Viale Delle Acacie, Napoli;
- Istituto Comprensivo Galileo Galilei, Arienzo (Caserta);
- Scuola Secondaria 1° grado Giovanni XXIII, Grottaminarda (Avellino);
- Istituto Comprensivo Gatto, Battipaglia (Salerno);
- Scuola Secondaria 1° grado Pirandello –Svevo, Napoli.

## Articoli dal prossimo numero

*Forthcoming articles*

### Casi Clinici per imparare

**Editoriale** Stefania La Grutta

---

**Malformazione adenomatoideo-cistica congenita del polmone (CCAM). Caso Clinico**

Ahmad Kantar

---

**Tracheomalacia associata a BBP: descrizione di un caso clinico**

Fabio Cardinale

---

**Una atelettasia che non si risolve**

Elisabetta Bignamini

---

**Un caso di grave insufficienza respiratoria secondaria a pneumomediastino**

Fulvio Esposito

---

**Ernia diaframmatica congenita: dalla compromissione polmonare alla diagnosi genetica**

Giuliana Ferrante

---

**Granulomatosi di Wegener ad esordio polmonare**

Gian Luigi Marseglia

---

**Uno strano caso di asma difficile**

Giorgio Piacentini

---

**Un inconsueto caso di tosse e sindrome restrittiva in un adolescente”**

Giancarlo Tancredi

---

# Conferenze e meeting

## Conferences and meetings

### APRILE 2015

---

#### IV CONGRESSO PEDIATRICO CALANTINO DI PATOLOGIE ALLERGICHE E COMORBITÀ NEUROLOGICHE

**Clatagirone (CT) 10-11 aprile 2015**

Segreteria organizzativa: SA.MA Service e Congressi - Messina

Tel/Fax 090 06811318

Mail: segreteriasamacongressi.it

#### DAL NEONATO A RISCHIO AL BAMBINO CON DISABILITÀ: I PERCORSI DI CURA ALL'INTERNO DELL'AZIENDA USL DI BOLOGNA

**Bologna 10-11 aprile 2015**

Segreteria organizzativa: Momedata Eventi - Bologna

Tel. 051 5876729 - Fax 051 5876848

Mail: info@momedataeventi.com

#### MEDITERRANEA VIII CONGRESSO NAZIONALE DI PEDIATRIA

**Bari 10-11 aprile 2015**

Segreteria organizzativa: iDea Congressi - Roma

Tel 06 3638 1573 - Fax 06 36307682

Mail: info@ideacpa.com

#### CAPRI 2015 - AGGIORNAMENTI IN PEDIATRIA

**Capri (NA), 23 Aprile 2015**

Segreteria Organizzativa: Penta Eventi - Roma

Tel. 06 45491195 r.a. - Fax 06 92941807

Mail: info@pentaeventi.com

#### FORMAT 2015 LABORATORIO DI INTERATTIVITÀ TRA LIVELLI SPECIALISTICI PEDIATRICI

**Verona 23-24 aprile 2015**

Segreteria organizzativa: iDea Congressi - Roma

Tel 06 3638 1573 - Fax 06 36307682

Mail: info@ideacpa.com

#### NAPUL'È. PEDIATRIA PREVENTIVA E SOCIALE

**Napoli, 30 aprile- 3 maggio 2015**

Segreteria organizzativa: iDea Congressi - Roma

Tel 06 3638 1573 - Fax 06 36307682

Mail: info@ideacpa.com

### MAGGIO 2015

---

#### GESTIONE EMODINAMICA NEI PRINCIPALI SCENARI DI INSUFFICIENZA RESPIRATORIA NEONATALE

**Pollenzo(CN), 5-7 maggio 2015**

Segreteria organizzativa: Biomedica - Milano

Mail: bm@biomedica.net

#### 7TH EUROPEADIATRICS

**Firenze, 13-16 maggio 2015**

Segreteria organizzativa: iDea Congress - Roma

Tel 06 3638 1573 - Fax 06 36307682

Mail: info@ideacpa.com

#### CORSO DI PERFEZIONAMENTO IN ECOGRAFIA CLINICA PEDIATRICA "ECOPED 2015"

**Pistoia 18-21 maggio 2015**

Segreteria organizzativa: Biomedica - Milano

Tel. 02 45498282 - Fax: 02 45498199

Mail: bm@biomedica.net

#### LE PATOLOGIE DEL III MILLENNIO: TRA EPIGENETICA, NUTRIZIONE, STILI DI VITA ACQUISITI. COME AFFRONTARLE

**Napoli, 22-23 Maggio 2015**

Segreteria organizzativa: New Events - Aversa (Ce)

Tel./Fax 081.5032965

Mail: newevents.perri@gmail.com

#### TERAPIE DELLE ALLERGIE: UPDATE 2015

**Roma 29-30 maggio 2015**

Segreteria organizzativa: Fisioair - Roma

Tel.: 06 6873034 - Fax: 06 68309354

Mail: medlearning@medlearning.net

### GIUGNO 2015

---

#### 71° CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PEDIATRIA

**Roma, 4-6 giugno 2015**

Segreteria organizzativa: Biomedica - Milano

Tel. 02 45498282 - Fax: 02 45498199

Mail: [bm@biomedica.net](mailto:bm@biomedica.net)

#### CRESCENDO

**Torino 12-13 giugno 2015**

Segreteria organizzativa: CENTRO CONGRESSI  
INTERNAZIONALE - Torino

Tel. 011 2446911 - Fax 011 2446950

Mail: [info@congressiefiere.com](mailto:info@congressiefiere.com)

#### CORSO DI FISIOPATOLOGIA E TRATTAMENTO DELLE PATOLOGIE RESPIRATORIE DELLA PRIMA INFANZIA

**Napoli, 15-16 giugno 2015**

Segreteria organizzativa: Biomedica - Milano

Tel. 02 45498282 - Fax: 02 45498199

Mail: bm@biomedica.net

# XIX Congresso Nazionale SIMRI

Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili



Torino, 22-24 Ottobre 2015  
Centro Congressi Lingotto

**Programma Preliminare**

  
**SIMRI**  
società italiana per le malattie  
respiratorie infantili



Torino, 22-24 Ottobre 2015

**Presidenti Onorari**  
Pier Angelo Tovo, Torino  
Alberto G. Ugazio, Roma

**Presidente del Congresso**  
Renato Cutrera, Roma

**Coordinamento Scientifico**  
Elisabetta Bignamini, Torino  
Massimo Landi, Torino

**Comitato Scientifico**  
Consiglio Direttivo SIMRI

**Segreteria Scientifica**  
Manuela Goia, Torino  
Irene Esposito, Torino

**Consiglio Direttivo SIMRI**

**Presidente**  
Renato Cutrera, Roma

**Past President**  
Eugenio Baraldi, Padova

**Vice Presidente**  
Massimo Pifferi, Pisa

**Tesoriere**  
Fulvio Esposito, Napoli

**Consiglieri**  
Elisabetta Bignamini, Torino  
Carlo Capristo, Napoli  
Salvatore Cazzato, Bologna  
Massimo Landi, Torino  
Deborah Snijders, Padova  
Giancarlo Tancredi, Roma

**Revisori dei Conti**  
Fabio Decimo, Napoli  
Ahmad Kantar, Ponte San Pietro (BG)

**Direttore Pneumologia Pediatrica**  
Francesca Santamaria, Napoli

**Direttore Sito Web**  
Luigi Terracciano, Milano

Cari Colleghi,

a nome del Consiglio Direttivo SIMRI ed in particolare dei colleghi Elisabetta Bignamini e Massimo Landi, Vi attendiamo numerosi a Torino in occasione del XIX Congresso Nazionale della Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili (SIMRI) che si svolgerà dal 22 al 24 ottobre 2015.

Il programma scientifico che stiamo elaborando, vuole rappresentare, per tutti i partecipanti, un valido aggiornamento sui principali aspetti fisiopatologici, clinici, diagnostici, terapeutici e gestionali delle malattie respiratorie infantili nonché una fondamentale occasione di incontro e scambio di opinioni per tutti i pediatri che, inevitabilmente, si devono confrontare, nella loro pratica quotidiana, con patologie respiratorie comuni o complesse.

Come di consueto, saranno coinvolti, i maggiori cultori della materia, che riporteranno non solo gli aspetti teorici e gli aggiornamenti scientifici sull'argomento da loro trattato, ma anche la loro esperienza nella gestione pratica. Il confronto ed il dibattito che ne scaturirà ci permetterà di approfondire le nostre conoscenze e di trasferirle nella pratica clinica, con l'obiettivo di migliorare la qualità di vita dei pazienti.

Questa edizione si focalizzerà, tra gli altri temi trattati, tutti molto attuali, su:

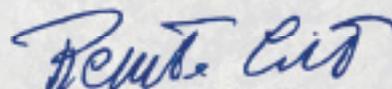
- Infezioni e asma
- La gestione dell'asma difficile
- Il futuro dell'asma
- Le urgenze respiratorie
- Malacia delle vie aeree e wheezing
- Patologia ciliare e clearance muco ciliare
- Disturbi respiratori del sonno
- Fumo di sigaretta e patologia respiratoria
- Alimentazione e malattie respiratorie
- Ossigenoterapia
- Ventilazione a lungo termine

Inoltre, per rendere più interattiva la partecipazione, saranno previsti specifici corsi di formazione teorico-pratici "hands on" a numero chiuso, riservati a coloro che vorranno approfondire specifiche tematiche.

Come innovazione nell'ambito del Congresso, partendo da Torino, abbiamo deciso di coinvolgere la cittadinanza e le scuole, lanciando la campagna "Viviamo bene per respirare meglio" che quest'anno avrà il titolo "Dai un calcio al fumo".

Di tale iniziativa sarà data ampia diffusione attraverso i mass media e le testate giornalistiche nazionali. Sin da adesso, posso anticiparvi che testimonial della manifestazione sarà *Massimiliano Allegri*.

Nel ringraziarVi per l'attenzione, Vi saluto cordialmente.

  
Per il Comitato Scientifico



Torino, 22-24 Ottobre 2015

## Giovedì 22 Ottobre



10.00

Registrazione Partecipanti

14.00-17.00

Corsi Pre Congressuali in sessioni parallele\*

GESTIONE DELLE VIE  
AEREE IN URGENZA

DIAGNOSTICA  
FUNZIONALE  
RESPIRATORIA

MALATTIE  
RESPIRATORIE  
E STILI DI VITA

INSUFFICIENZA  
RESPIRATORIA CRONICA  
E DISTURBI DEL SONNO

### Cerimonia Inaugurale

APERTURA LAVORI

CONSEGNA DEI PREMI SIMRI

LETTURE MAGISTRALI

19.30

Chiusura lavori

\* I corsi sono a numero chiuso per un massimo di 50 partecipanti per corso

## Venerdì 23 Ottobre

8.30 Inizio lavori

### Corsi in sessioni parallele\*

IMAGING	Corsi in sessioni parallele*			
	CITOLOGIA NASALE	GIOVANI IN FORMAZIONE: COME SCRIVERE CON SUCCESSO UN ARTICOLO SCIENTIFICO	ASMA: WHEEZING PRESCOLARE	OSSIGENO ALTI FLUSSI

### Corsi in sessioni parallele\*

CLINICAL GRAND ROUND	Corsi in sessioni parallele*			
	RINOSINUSITE	DALLE LINEE GUIDA AL PDTA	ASMA: QUANDO NON RISPONDE ALLA TERAPIA	OSSIGENOTERAPIA DOMICILIARE E VENTILOTERAPIA

### LETTURE MAGISTRALI

### Simposi in sessioni parallele

#### LA TOSSE

- Inquadramento generale
- La pertosse oggi
- Tosse psicogena
- Tosse alte e basse vie

#### INFEZIONI POLMONARI GRAVI

- Flow chart diagnostica
- La discinesia ciliare primaria
- Fibrosi cistica

### Simposio in plenaria

#### INFEZIONI RESPIRATORIE RICORRENTI

- Virus e bronchiolite
- Quando sospettare l'immunodeficienza
- Terapia

18.00 - 19.30 Assemblea Soci SIMRI

\* I corsi sono a numero chiuso per un massimo di 50 partecipanti per corso

Torino, 22-24 Ottobre 2015

## Sabato 24 Ottobre



8.30 Inizio lavori

### Simposi in sessioni parallele

#### LA TERAPIA DELLE MALATTIE RESPIRATORIE: VECCHI E NUOVI RIMEDI

- Salbutamolo < 2 anni
- ITS
- Nuove terapie combinate
- Anti IgE

#### MALATTIE POLMONARI COMPLESSE

- Ipereosinofilie: inquadramento generale
- Churg Strauss
- ABPA e Anticorpi monoclonali

### Simposio in plenaria

#### IL PEDIATRA ED IL FUMO DI TABACCO

- La BPCO: una malattia pediatrica?
- Le patologie respiratorie Fumo correlate
- Disassuefazione al fumo di tabacco tra farmaci e tecniche psicologiche
- Fumo attivo e passivo: un ruolo per il Pediatra?

13.00 Fine lavori

### 14.00 - 17.00 SPAZIO EDUCAZIONALE: "DAI UN CALCIO AL FUMO"

Parteciperanno attivamente la cittadinanza e Scuole di Torino.  
Di tale iniziativa sarà data ampia diffusione attraverso i mass media  
e le testate giornalistiche nazionali.  
**Testimonial della manifestazione sarà Massimiliano Allegri.**

## Sede

Centro Congressi Lingotto - Viale Nizza 280 - 10126 Torino

## CONTRIBUTI SCIENTIFICI

Contributi scientifici su argomenti correlati alle malattie respiratorie infantili, potranno essere inviati, **entro il 30 giugno 2015**. Per inviare un lavoro sarà necessario registrarsi sul sito del Congresso [www.centercongressi.com/simri2015](http://www.centercongressi.com/simri2015) ed inserire, nella "sezione abstract", il contributo scientifico. Ogni partecipante potrà inviare un solo contributo come primo autore.

Il Comitato Scientifico selezionerà, a Suo insindacabile giudizio, i **cinque** lavori che riterrà più interessanti, innovativi ed originali. I lavori prescelti saranno presentati come comunicazioni orali e riceveranno un premio di euro 1.500,00. I premi saranno riservati a soci SIMRI di età inferiore a 37 anni in regola con il pagamento della quota associativa a tutto il 2015. Tutti gli altri lavori potranno essere presentati nella sessione poster.

## QUOTE D'ISCRIZIONE (IVA inclusa)

	Entro il 31/07/2015	Dal 01/08/2015
Soci SIMRI <sup>(1)</sup>	€ 450,00	€ 500,00
Non Soci	€ 530,00	€ 580,00
Specializzandi <sup>(2)</sup>	€ 125,00	€ 150,00

<sup>(1)</sup> La quota è applicabile solo ai soci in regola con il pagamento della quota associativa a tutto il 2015.

<sup>(2)</sup> All'atto dell'iscrizione bisognerà inviare un certificato di frequenza della scuola di specializzazione.

Le quote includono: la partecipazione alle sessioni scientifiche, il kit congressuale, il CD con i riassunti, l'attestato di partecipazione, la certificazione ECM, i coffee break, le colazioni di lavoro, il cocktail e la cena di benvenuto.

La partecipazione ai Corsi in programma è riservata agli iscritti al Congresso ma ciascun corso potrà avere un massimo di 50 partecipanti.

Al fine dell'assegnazione ai Corsi in programma, è indispensabile che i partecipanti esprimano la propria preferenza (1=prima scelta; 2= seconda scelta; 3=terza scelta; 4=quarta scelta).

L'assegnazione sarà fatta, ad insindacabile giudizio del Comitato Scientifico, tenendo conto della data di ricezione della richiesta di iscrizione al corso (farà fede il timbro postale, l'imprinting del fax o la data della e-mail), e alla preferenza espressa. Pertanto, qualora si esaurissero i posti disponibili, potrà verificarsi il caso in cui un partecipante venga assegnato ad un corso che non era indicato come "prima scelta".

## ECM

All'evento, accreditato per un un massimo di 500 partecipanti presso la Commissione Nazionale per la formazione Continua, saranno assegnati, secondo la normativa vigente, cinque crediti ECM.

Le figure professionali, per i quali verranno richiesti i crediti ECM sono: **Biologo e Medico Chirurgo** con le seguenti specialità: Allergologia ed Immunologia Clinica, Continuità Assistenziale, Farmacologia e Tossicologia Clinica, Gastroenterologia, Genetica Medica, Igiene degli Alimenti e della Nutrizione, Igiene-Epidemiologia e Sanità Pubblica, Malattie dell'Apparato Respiratorio, Malattie Infettive, Medicina Generale (medici di famiglia), Medicina Interna, Medicina Termale, Medicina dello Sport, Medicina e Chirurgia d'Accettazione e d'Urgenza, Microbiologia e Virologia, Neonatologia, Otorinolaringoiatria, Pediatria, Pediatria (pediatri di libera scelta).

Si precisa, inoltre, che potranno essere accreditati alcuni corsi teorico-pratici per i quali saranno attribuiti crediti "ad hoc".

Sarà, inoltre, previsto un corso per personale paramedico (**Infermiere, Infermiere Pediatrico e Fisioterapista**) per il quale sarà fatto uno specifico accreditamento.

Collegandosi al sito: [www.centercongressi.com/simri2015](http://www.centercongressi.com/simri2015) sarà possibile effettuare la registrazione al congresso, la prenotazione alberghiera e l'invio di un contributo scientifico.

Sul sito sono anche presenti le politiche di cancellazione nonché i termini di registrazione e di inserimento di un contributo scientifico.



## XIX Congresso Nazionale SIMRI

Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili

Torino, 22-24 Ottobre 2015  
Centro Congressi Lingotto



Segreteria Organizzativa e Provider ECM  
Via G. Quagliariello, 27 • 80131 Napoli  
tel. 081.19578490 • [info@centercongressi.com](mailto:info@centercongressi.com)  
[www.centercongressi.com/simri2015](http://www.centercongressi.com/simri2015)