



SOCIETÀ ITALIANA
PER LE MALATTIE
RESPIRATORIE INFANTILI
SIMRI

Pneumologia Pediatrica

Volume 2, n. 6

Rivista trimestrale
Spedizione in A.P. - 45%
art. 2 comma 20/b
legge 662/96
N. 1047 del 12/07/2002 - Pisa
Reg. Trib. PI n. 12
del 3 giugno 2002

Pneumopatie da difetto ciliare

La diagnostica per immagini nelle broncopneumopatie
recidivanti e croniche dell'infanzia e dell'adolescenza <

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

L'analisi dell'attività ciliare nella patologia
respiratoria cronica in età pediatrica <

*Official Journal
of the Italian Pediatric
Respiratory Society*

L'esame morfometrico ultrastrutturale
delle ciglia dell'epitelio respiratorio <

Studio del trasporto mucociliare del polmone:
i metodi clinici di analisi <

Il trattamento della discinesia ciliare
primaria in età pediatrica <

Infezioni Respiratorie Ricorrenti (I.R.R.) e Patologia Ciliare:
attualità, controversie, prospettive future <

Editoriale	1
<i>View point</i>	
La diagnostica per immagini nelle broncopneumopatie recidivanti e croniche dell'infanzia e dell'adolescenza	2
<i>Diagnostic imaging in recurrent and chronic bronchopulmonary diseases in childhood and adolescence</i>	
<i>Davide Caramella, Fabio Falaschi, Silvia Navari, Priene Galvao, Vincenzo Ragazzo, Massimo Pifferi</i>	
L'analisi dell'attività ciliare nella patologia respiratoria cronica in età pediatrica	10
<i>Analysis of ciliary motion in childhood chronic respiratory disease</i>	
<i>Massimo Pifferi, Vincenzo Ragazzo</i>	
L'esame morfometrico ultrastrutturale delle ciglia dell'epitelio respiratorio	20
<i>Morphometric ultrastructural analysis of the cilia of the respiratory tract epithelium</i>	
<i>Angela M. Cangiotti</i>	
Studio del trasporto mucociliare del polmone: i metodi clinici di analisi	32
<i>Lung mucociliary transport: clinical methods of analysis</i>	
<i>Simonetta Baldi</i>	
Il trattamento della discinesia ciliare primaria in età pediatrica	40
<i>Treatment of primary ciliary dyskinesia in children</i>	
<i>Massimo Pifferi, Vincenzo Ragazzo, Silvia Navari, Emanuela De Marco, Priene Galvao</i>	
Infezioni Respiratorie Ricorrenti (I.R.R.) e Patologia Ciliare: attualità, controversie, prospettive future	47
<i>Recurrent Respiratory Tract Infections and Ciliary Pathology in Children: Present, Different Opinions, Prospects for the future</i>	
<i>Nicola Oggiano, Stefano Bruni, Orazio Gabrielli, Giovanni V. Coppa</i>	
Poster	58
Congressi	60
<i>Congresses</i>	
Scheda per domanda di ammissione alla SIMRI	62

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

Volume 2, n. 6 - Giugno 2002

Spedizione in A.P. - 45%

art. 2 comma 20/b

legge 662/96 - N. 1047 del 12/07/2002 - Pisa

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

Direttore scientifico

Angelo Barbato (Padova)

Vice-Direttore scientifico

Giuliano Baldini (Pisa)

Comitato editoriale

Baraldi Eugenio (Padova)

Bernardi Filippo (Bologna)

Boner Attilio (Verona)

Capra Lucetta (Ferrara)

Chiamenti Gianpietro (Verona)

Corrias Adriano (Cagliari)

De Benedictis Fernando Maria (Perugia)

Fiocchi Alessandro (Milano)

Indinnimeo Luciana (Roma)

La Rosa Mario (Catania)

Leonardi Salvatore (Catania)

Longo Giorgio (Trieste)

Mappa Luigi (Bari)

Midulla Fabio (Roma)

Miraglia Del Giudice Michele (Napoli)

Pifferi Massimo (Pisa)

Pajno Giovanni (Messina)

Pelosi Umberto (Cagliari)

Rossi Giovanni (Genova)

Rusconi Franca (Milano)

Villa Maria Pia (Roma)

Villani Alberto (Roma)

Gruppo Allergologia

coord. G. Pajno (Messina)

Gruppo di Educazione

coord. S. Guarnaccia (Brescia)

Gruppo Endoscopia Bronchiale

coord. N. Forenza (Perugia)

Gruppo Fisiopatologia Respiratoria

coord. R. Cutrera (Roma)

Gruppo di Riabilitazione Respiratoria

coord. G. Tancredi (Roma)

Gruppo Sindrome Apnea Ostruttiva

coord. L. Brunetti (Bari)

Direttore responsabile

Angelo Barbato (Padova)

© Copyright 2002 by Primula Multimedia S.r.L.

Editore

Primula Multimedia S.r.L.

via C. Angiolieri, 7

56010 Ghezzano - Pisa

Tel. 050 877057; fax 050 877910

e-mail: info@primulaedizioni.it

Redazione

Angela Minuti

Realizzazione Editoriale

Primula Multimedia S.r.L.

Stampa

Litografia VARO - San Giuliano Terme (PI)

Anche quest'anno nella nostra Rivista riportiamo i due poster (a pag. 58 e pag. 59) che sono stati premiati dal Direttivo SIMRI in occasione del 6° Congresso Nazionale della Società tenutosi a Lido di Venezia dal 12 al 15 giugno 2002, della cui realizzazione dobbiamo ringraziare il Prof. Franco Zacchello per l'eccellente organizzazione.

Questo numero della Rivista è dedicato alle pneumopatie croniche da difetto ciliare.

Le ciglia delle cellule di rivestimento dell'apparato respiratorio hanno la funzione di promuovere la migrazione di particelle e secreti dalle vie aeree superiori e inferiori nel faringe dove possono essere o deglutite o espulse all'esterno. Il loro lavoro di pulizia bronchiale è permesso dalla presenza del muco in cui le ciglia sono immerse e che esse spingono verso l'esterno delle vie aeree con movimento sincrono. Se l'apparato muco-ciliare non funziona perché le ciglia sono discinetiche allora le secrezioni che ristagnano favoriscono l'attaccamento sull'epitelio delle vie aeree di microorganismi patogeni che possono causare una flogosi cronica suppurativa. L'anomalia ciliare dunque, ben descritta da B.A. Afzelius 25 anni fa circa (1), deve essere presa in considerazione in tutti i bambini con bronchiectasie soprattutto bilaterali e con studio genetico per la fibrosi cistica negativo.

In questi ultimi anni alle prime anomalie ciliari descritte e caratterizzate prevalentemente da assenza delle braccia esterne di dineina se ne sono aggiunte altre presenti in una percentuale variabile di ciglia vibratili permettendo così le individuazioni di nuove alterazioni che rendono questo capitolo della Pneumologia Pediatrica di particolare interesse ed attualità.

Quest'anno inoltre il Ministero della Salute ha reso obbligatorio il Registro delle Malattie Rare in cui sono inclusi anche i pazienti con anomalie delle ciglia delle vie aeree (S. Kartagener; *Ciglia discinetiche*, et al.). È auspicabile che la nostra Società dia delle linee guida sulla diagnosi e sulla terapia per i bambini affetti da tali anomalie da estendere a livello nazionale.

1. Afzelius BA. *A human syndrome caused by immotile cilia*. Science 1976; 193: 317-319.

Angelo Barbato
e-mail: barbato@pediatria.unipd.it

Davide Caramella, Fabio Falaschi**, Silvia Navari***, Priene Galvao***, Vincenzo Ragazzo***, Massimo Pifferi****

* Divisione di Radiologia Diagnostica e Interventistica, Università di Pisa, ** Radiodiagnostica 2°, Azienda Ospedaliera Pisana, *** Fisiopatologia Respiratoria ed Allergologia - U.O. Pediatria 1 Dipartimento di Medicina della Procreazione e dell'Età Evolutiva - Università di Pisa

La diagnostica per immagini nelle broncopneumopatie recidivanti e croniche dell'infanzia e dell'adolescenza

Diagnostic imaging in recurrent and chronic bronchopulmonary diseases in childhood and adolescence

Parole chiave: radiografia standard del torace; tomografia computerizzata ad alta risoluzione; discinesia ciliare primaria; fibrosi cistica
Key words: *conventional chest X-ray; high resolution computed tomography; primary ciliary dyskinesia; cystic fibrosis*

Riassunto. Lo studio radiologico si colloca nell'ambito di un ampio ventaglio di metodiche di diagnostica per immagini e deve essere inserito in un programma di accertamenti stabilito in base ad una rigorosa valutazione clinica del piccolo paziente.

L'esame radiologico più importante è la radiografia standard del torace. In aggiunta a questa tecnica di primo impiego, di recente si è andato consolidando il ruolo della Tomografia Computerizzata (TC) che, soprattutto se eseguita con la tecnica ad alta risoluzione (High Resolution Computed Tomography, HRCT), è in grado di assicurare nei bambini collaboranti immagini di elevato contenuto diagnostico, risultando quindi spesso decisiva per l'interpretazione dei casi più difficili. Le alterazioni parenchimali possono andare dall'intrappolamento aereo all'emfisema, dal consolidamento alveolare all'atelectasia e possono associarsi a bronchiectasie e quadri di fibrosi.

In particolare nella discinesia ciliare primaria e nella fibrosi cistica, la TC consente un adeguato bilancio della severità della malattia grazie alla valutazione dell'estensione delle bronchiectasie, dell'entità dell'ispessimento peribronchiale, delle generazioni bronchiali coinvolte, della eventuale presenza di ascessi, del numero di bolle, nonché dell'estensione delle aree di atelectasia, di consolidamento e di iperinsufflazione.

Summary. *Radiological examinations belong to a wide spectrum of imaging diagnostic modalities and have to be included in a diagnostic work-up defined on the basis of a careful clinical evaluation of the child.*

The main radiological tool is the conventional chest X-ray. In addition to this first level modality, in the recent years the role of Computed Tomography has become increasingly important. In particular, high resolution computed tomography (HRCT) allows to obtain very informative diagnostic images in collaborating patients and therefore are often decisive for the interpretation of difficult cases. The parenchymal abnormalities include: air trapping, emphysema, alveolar opacity, atelectasis, bronchiectasis, and fibrosis.

In primary ciliary dyskinesia and in cystic fibrosis, CT permits to precisely assess the severity of the disease by evaluating the extension of bronchiectasis, the degree of peribronchial thickening, the involvement of bronchial generations, the presence of abscess, the number of bullae, and the extension of opacity, atelectasis and hyperinsufflation.

Corrispondenza: Prof. Davide Caramella, Divisione di Radiologia Diagnostica e Interventistica, Università di Pisa
Via Roma 67, 56126 Pisa e-mail: caramella@do.med.unipi.it

Introduzione

Nell'ambito delle infezioni respiratorie ricorrenti in età pediatrica sono sempre più numerosi i bambini con interessamento delle basse vie aeree. Tali infezioni possono assumere una particolare gravità e non giungere mai a completa guarigione, per cui i bambini interessati presentano sintomi respiratori in maniera continuativa. Questi soggetti possono mostrare anche una tendenza al decadimento progressivo della funzione respiratoria. Quindi, tra i bambini con infezioni respiratorie ricorrenti si deve distinguere un sottogruppo di

soggetti nei quali il protrarsi della condizione morbosa esprime uno stato funzionale e/o anatomico dell'apparato respiratorio non normale e potenzialmente pericoloso per le conseguenze a medio e lungo termine, tanto da configurare il quadro di una broncopneumopatia recidivante o cronica (1).

Per questo motivo e allo scopo di giungere ad un corretto inquadramento diagnostico può essere necessario applicare, dopo un'accurata indagine anamnestica ed uno scrupoloso esame obiettivo, una serie di procedure diagnostiche, da decidere caso per caso: valutazione dei parametri immunologici,

prove allergologiche, studio radiologico del torace e dei seni paranasali, prove di funzionalità respiratoria, test del sudore, studio del movimento e dell'ultrastruttura delle ciglia della mucosa respiratoria, valutazione *in vivo* della clearance muco-ciliare, studio broncoscopico con eventuale Lavaggio Bronco-Alveolare (BAL), studio del reflusso gastro-esofageo. Nell'ambito di questo lavoro ci limiteremo ad approfondire gli aspetti relativi alla diagnostica per immagini.

Studio radiologico

Lo studio radiologico si colloca nell'ambito di un ampio ventaglio di metodiche diagnostiche e deve essere inserito in un programma di accertamenti stabilito in base ad una rigorosa valutazione clinica del piccolo paziente.

Lo strumento radiologico più importante è ovviamente il radiogramma standard del torace da acquisire nelle due proiezioni, e preferibilmente, soprattutto nei pazienti più piccoli, in sedi nelle quali vi sia esperienza di indagini diagnostiche in età pediatrica (disponibilità di calchi o altri mezzi di contenzione), allo scopo di assicurare l'immobilità dei bambini ed evitare loro inutili esposizioni ai raggi X, oltre che ai genitori ed al personale addetto.

Accanto alla diagnostica per immagini tradizionale, negli ultimi anni si è andato consolidando, tuttavia, anche l'impiego della Tomografia Computerizzata (TC) che, soprattutto se eseguita con la tecnica ad alta risoluzione (High Resolution Computed Tomography, HRCT), è in grado di assicurare nei bambini collaboranti immagini di elevato contenuto diagnostico, risultando quindi spesso decisiva per l'interpretazione dei casi più difficili (2).

Nei bambini è possibile adottare tecniche simili a quelle impiegate comunemente nell'adulto: in particolare per lo studio ad alta risoluzione è indicato l'uso di alti milliamperaggi e la scelta di una collimazione estremamente fine (1 mm). Sono peraltro state proposte anche tecniche di compromesso, quali quelle che impiegano milliamperaggi più contenuti (60-80 mA) e spessori di strato più elevati (3 mm), allo scopo di ridurre la dose cercando di ottenere comunque l'informazione diagnostica desiderata. Nei soggetti più piccoli alcuni artefatti respiratori sono inevitabili, a meno che non si voglia ricorrere alla sedazione (3), che peraltro non sempre risulterebbe giustificata. Per ridurre i tempi d'esame e quindi evitare di ricorrere alla sedazione nel caso di bambini scarsamente collaboranti, vi sarà un

sempre maggior ricorso alle nuove apparecchiature TC basate su tecnologia spirale a detettore singolo o multiplo, che consentono di esaminare l'intero ambito toracico in pochi secondi.

In ogni caso è importante ribadire che la TC costituisce una scelta diagnostica di secondo livello, sempre scrupolosamente mirata a rispondere ai quesiti posti dall'indagine clinica e/o da precedenti radiogrammi. In molti casi può essere utile estendere l'esame TC allo studio dei seni paranasali, poiché l'associazione fra patologia delle basse vie aeree e patologia sinusale è molto frequente nell'infanzia (Figura 1, a-b).

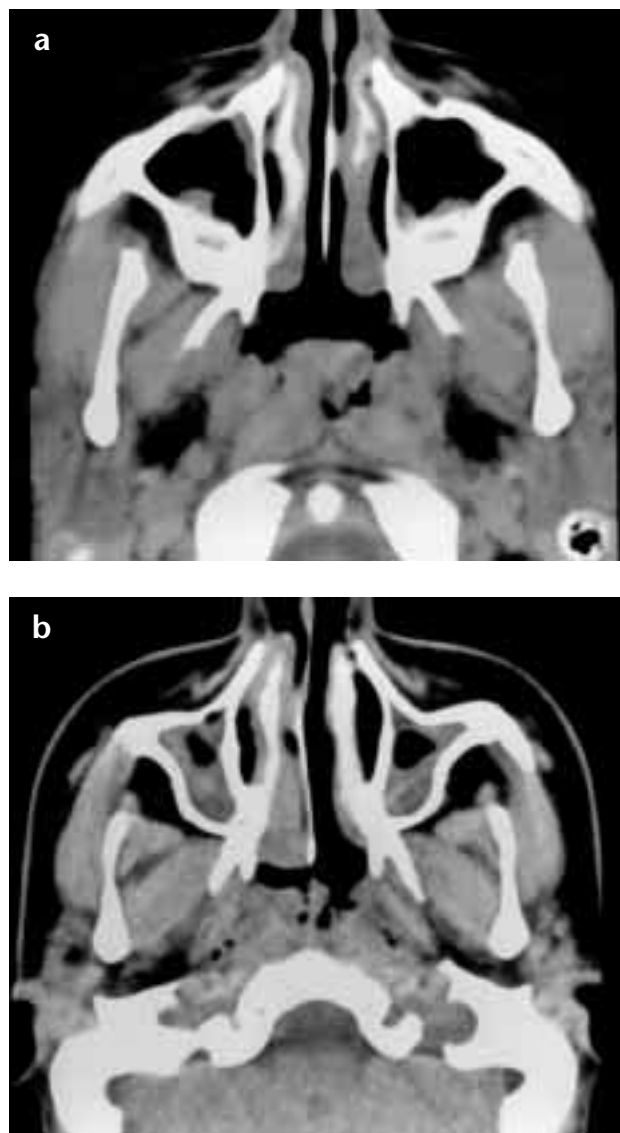


Figura 1 a, Esempio di limitati ispessimenti pseudo-polipoidi a carico della mucosa dei seni mascellari, **b**, quadro di sinusopatia mascellare più grave: la mucosa appare diffusamente ispessita. Coesiste interessamento della mucosa nasale.

Inquadramento delle affezioni

Ancora non codificato è l'inquadramento classificativo delle affezioni respiratorie recidivanti e croniche dell'infanzia e dell'adolescenza. In questa sede ci limiteremo ad elencare le principali patologie cercando di precisarne il momento patogenetico. Tra queste condizioni, le alterazioni anatomiche delle vie respiratorie sono abbastanza aspecifiche e sono rappresentate sostanzialmente da: bronchiectasie, ispessimento delle pareti bronchiali, infarcimento mucosale. Esse possono essere identificate al radiogramma standard, sotto forma di opacità ad "anello", linee bronchiali o opacità ramificate, ma molto più agevolmente sono rappresentate alla TC (4-7), secondo una semeiotica ormai ampiamente consolidata e basata sulla fine rappresentazione anatomica consentita da questa metodica.

Le alterazioni parenchimali possono andare dall'intrappolamento aereo all'enfisema, dal consolidamento alveolare all'atelectasia e possono associarsi a cisti e formazioni ascessuali.

Tutte queste alterazioni possono essere presenti, in varia combinazione, nella fibrosi cistica (8-10), nella quale si accompagnano talvolta a manifestazioni extratoraciche (tipica e da ricercare sempre è l'atrofia pancreatica).

Le alterazioni broncopolmonari dimostrate radiograficamente, comunque, sono soltanto indicative dal punto di vista diagnostico. Infatti per giungere alla diagnosi è innanzitutto necessario il sospetto clinico. In questo senso va ricordato che, anche se la maggioranza dei bambini con fibrosi cistica presenta una storia di sintomi ricorrenti ed inaggravanti a carico delle vie aeree inferiori ed un aspetto denutrito, siamo sostanzialmente di fronte ad una malattia estremamente pleiomorfa con età di presentazione molto varia. Inoltre, solo circa il 15% dei pazienti presenta ileo da meconio alla nascita e solo il 20% ha una storia familiare positiva per tale malattia. Infine, anche se, fin dagli anni '50 la dimostrazione di elevati livelli di cloro nel sudore ha rappresentato il principale metodo per confermare la diagnosi, oggi sappiamo che circa l'1-2% dei pazienti presentano solo livelli *borderline* di esso e la diagnosi definitiva è in questi casi affidata al *follow-up* che consentirà di mettere in evidenza nei soggetti realmente ammalati lo sviluppo di una malattia polmonare progressiva. Infatti, anche le indagini di genetica molecolare risultano di scarso aiuto per la loro identificazione, poiché le

mutazioni che si trovano più frequentemente associate ai quadri meno conclamati di malattia sono le più rare. Può, semmai, risultare utile in questi casi ai fini della precisazione diagnostica l'isolamento dello *Staphylococcus aureus* e di alcuni germi appartenenti al genere *Pseudomonas* nell'espettorato o nel BAL (11, 12).

Nelle primissime fasi della malattia i polmoni possono non presentare alterazioni radiologiche. Col progredire di essa si ha essenzialmente una bronchiolite che si presenta come un'ostruzione delle piccole vie aeree, visibile talora al radiogramma standard come un'area di iperinsufflazione. Fin dalle prime fasi si può anche osservare atelectasia lobare o segmentale prevalentemente a carico del lobo superiore. L'aggravarsi della malattia determina l'interessamento dei bronchi caratterizzato dall'ispessimento delle pareti, visibili sul radiogramma come alterazioni circolari se i raggi incidenti decorrono lungo le vie aeree, o come opacità lineari parallele (le cosiddette immagini "a binario") se decorrono perpendicolarmente ad esse.

Quando si sviluppano piccole cisti o bronchiectasie, esse si apprezzano sul radiogramma come opacità nodulari. La progressione della malattia conduce alla formazione di cisti più grandi (le quali possono essere radioopache quando sono ripiene di muco o radiotrasparenti quando sono relativamente vuote) e di vere e proprie zone fibrotiche che si esprimono come aree di addensamento parenchimale al radiogramma standard. È comunque alla TC, in particolare se eseguita con tecnica ad alta risoluzione, che si deve la possibilità di identificare con maggiore sicurezza le più comuni alterazioni polmonari presenti nella fibrosi cistica. Per un adeguato bilancio della severità della malattia è necessario tenere conto dell'estensione delle bronchiectasie, dell'entità dell'ispessimento peribronchiale, delle generazioni bronchiali coinvolte, della eventuale presenza di ascessi, del numero di bolle, nonché dell'estensione delle aree di atelectasia, di consolidamento e di iperinsufflazione. Le alterazioni descritte possono ritenersi la conseguenza del ristagno delle secrezioni nelle vie aeree inferiori favorito dalla loro elevata viscosità (Figura 2 a-b).

Non sorprende allora che anche nella Discinesia Ciliare Primaria (DCP) possano ritrovarsi alterazioni radiografiche simili a quelle descritte nella fibrosi cistica poiché nella DCP si determina un'alterata rimozione del muco per un difetto del

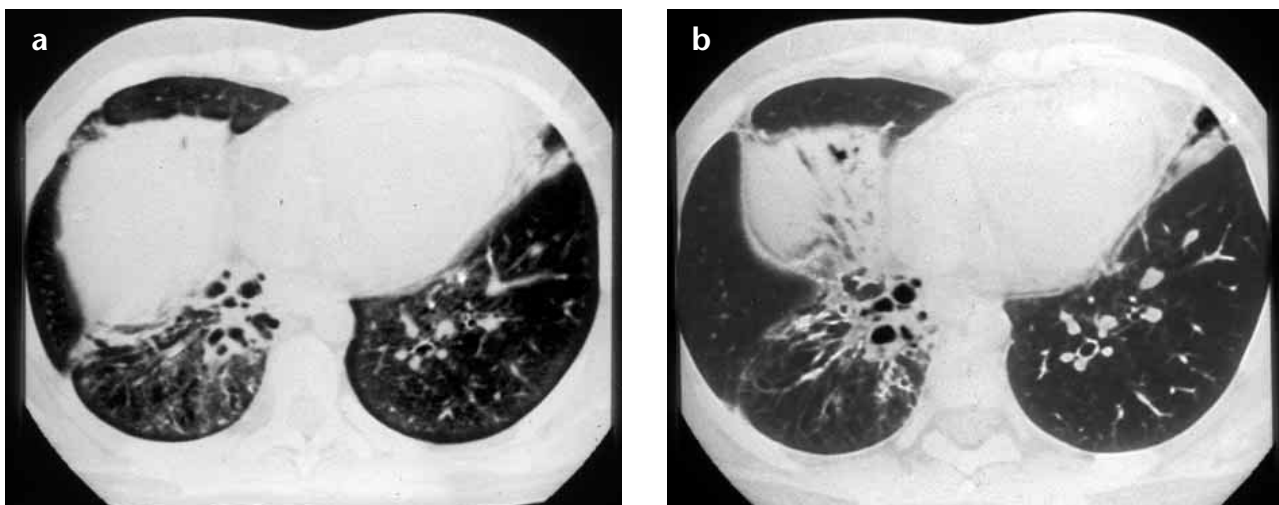


Figura 2 a, Fibrosi cistica con rilievo di grossolane bronchiectasie alla base di destra e di un'area di fibrosi a sinistra. **b**, Una scansione condotta a livello superiore documenta la presenza di un'area di consolidamento parenchimale a destra.

trasporto ciliare (13-16). In particolare, va ricordato che alla base della DCP possono riconoscersi numerosi difetti ultrastrutturali ciliari, ciascuno dei quali si traduce in un trasporto mucociliare inefficace. Oggi siamo a conoscenza, tuttavia, del fatto che anche una normale ultrastruttura ciliare è compatibile con la presenza di ciglia immobili o dotate di movimenti non coordinati e discinetici, comunque non adeguati a garantire la progressione del muco nelle vie aeree.

Nell'ambito della discinesia ciliare primaria deve essere quindi considerata la Sindrome di

Kartagener nella quale la presenza di bronchiectasie, sinusite ed infertilità nei soggetti adulti sono da ricondurre ad una alterazione congenita del movimento ciliare, a cui si associa la presenza di *situs viscerum inversus* (Figura 3 a-b)

Alterazioni radiologiche sovrapponibili, sia come varietà che come estensione, si ritrovano infine nei deficit del sistema immunitario (18). Esse appaiono invece di solito più circoscritte quando non sono presenti malattie di base che favoriscano il ricorrere o recidivare di una patologia infettiva.

Bronchiectasie anche isolate possono ad esempio

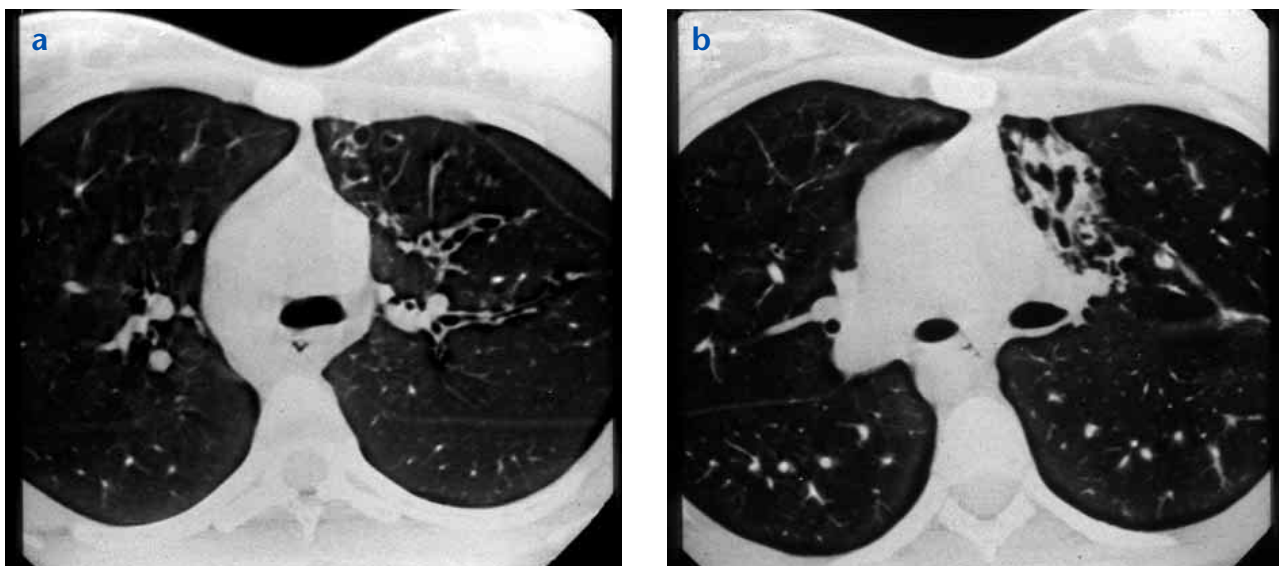


Figura 3 a, Sindrome di Kartagener con evidenza di bronchiectasie, a sinistra, in corrispondenza del lobo medio. **b**, Una scansione condotta a livello inferiore documenta irregolari bronchiectasie con marcato ispessimento delle pareti bronchiali.

determinarsi in seguito ad un processo infettivo delle basse vie aeree ad elevata espressività clinica o a lenta risoluzione. Tra queste, fino ad un passato relativamente recente, la più comune era certamente quella tubercolare nella quale la linfadenopatia peribronchiale e ilare con l'ostruzione bronchiale e il danno parenchimale rappresentavano il momento patogenetico più importante per la distruzione della parete bronchiale e lo sviluppo di bronchiectasie. Con il declino nell'incidenza della tubercolosi il suo ruolo nella patogenesi delle bronchiectasie è significativamente diminuito.

Anche la pertosse e il morbillo complicati dalla polmonite sono stati in precedenza associati con lo sviluppo di bronchiectasie, sebbene non vi sia una reale stima della loro incidenza a seguito di tali infezioni. In alcuni casi, tuttavia, le bronchiectasie non sarebbero dovute alla primitiva infezione, ma ad infezioni concomitanti o successive con altri agenti, in particolare *adenovirus* ed *herpesvirus*. L'infezione da *adenovirus* da sola, peraltro, può determinare in seguito bronchiectasie, così come quella da *mycoplasma pneumoniae* e da altri microrganismi che causino una broncopolmonite cronica necrotizzante. In questo caso le bronchiectasie possono essere il risultato di bronchioliti costrittive o obliterative. Questa definizione va sostituendo quella storica e più ampia di bronchiolite obliterante ed identifica quelle condizioni in cui è presente una fibrosi peribronchiolare su base solitamente post-infettiva, la quale circonda ed oblitera il lume delle piccole vie aeree, provocando intrappolamento aereo (19-21).

Il conseguente quadro anatomico ben dimostrato alla TC è l'alternarsi di aree di normale densità ad altre di ridotta densità (per intrappolamento aereo ed oligoemia) con aspetto "a mosaico". Questo segno, associato eventualmente alla presenza di bronchiectasie consente talora, in un appropriato contesto clinico, la diagnosi TC di bronchiolite costrittiva. La cosiddetta Sindrome di McLeod (o di Swyer-James) non è altro che una forma particolare della bronchiolite costrittiva nella quale le alterazioni sono prevalentemente limitate ad un solo polmone (polmone ipertrasparente monolaterale) (22).

Un ricordo particolare in età pediatrica può meritare l'inalazione accidentale di corpi estranei endobronchiali. Infatti, questa evenienza può non essere facilmente individuabile visto di solito che sono interessati bambini con età inferiore a tre

anni e che generalmente non consentono la raccolta di un'anamnesi affidabile. Inoltre i corpi estranei radiopachi che sarebbero evidenziati direttamente e con facilità già al radiogramma standard del torace, sono in realtà meno frequenti di quelli radiotrasparenti, che al contrario possono essere individuati soltanto sulla base dei segni indiretti nel radiogramma standard o con la TC (23-26).

Il mancato riconoscimento dell'inalazione di corpi estranei endobronchiali può essere alla base di una serie di complicanze a distanza, che non risultano molto diverse dalle affezioni respiratorie recidivanti e croniche fin qui descritte.

Nel riconoscimento della causa inalatoria di un *distress* persistente dobbiamo essere orientati in primo luogo da alcuni elementi clinici, quali la variabilità dei segni obiettivi, la mancata risposta ai trattamenti medici abitualmente efficaci e comunque l'andamento progressivamente ingravante del quadro respiratorio. La compromissione respiratoria può essere attribuita da un lato alla presenza di atelectasia da riassorbimento che si stabilisce a valle di una ostruzione completa, dall'altro all'enfisema a valvola che determina un progressivo intrappolamento d'aria.

Un aspetto importante da sottolineare è rappresentato dal fatto che tali segni radiologici si rendono apprezzabili solo a distanza di tempo dall'inalazione del corpo estraneo, presumibilmente perché vi è stato il tempo necessario al prodursi di un'alterazione rilevante della dinamica respiratoria distrettuale.

La radiografia del torace può assumere quindi particolare valore nella interpretazione diagnostica e può risultare utile nel selezionare i pazienti da avviare alla broncoscopia. La mancata rimozione dei corpi estranei con prolungata permanenza entro il lume bronchiale può infatti determinare ostruzione e infiammazione cronica delle vie aeree, che rappresentano i principali fattori nello sviluppo di bronchiectasie.

L'inquadramento dell'asma bronchiale come malattia infiammatoria cronica delle vie aeree, la cui evoluzione segue il naturale decorso della flogosi, ha permesso di comprendere meglio perché sia possibile in certi casi dimostrare con HRCT la presenza di anomalie irreversibili nei polmoni di soggetti affetti da tale malattia, quali le bronchiectasie, gli ispessimenti della parete bronchiale e la fibrosi (Figura 4) (27-33). Infatti

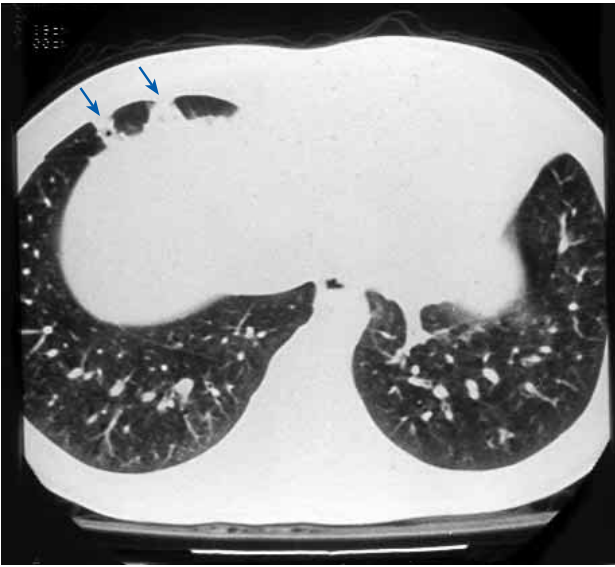


Figura 4 Rilievo di localizzate aree di fibrosi mantellare alla base polmonare di destra in bambino con asma bronchiale cronica.

l'infiammazione è già presente nelle vie aeree di pazienti con asma molto lieve ed aumenta con la severità dell'asma che è correlata con la sua durata nei pazienti allergici. Fin dai primi stadi essa conduce ad un processo di riparazione con completa rigenerazione e *restitutio ad integrum* oppure con sostituzione da parte di tessuto connettivo. Nella sottomucosa bronchiale dei pazienti asmatici si può quindi dimostrare un infiltrato cellulare, un incremento della massa muscolare, un'ipertrofia delle ghiandole mucose ed una riorganizzazione della matrice extracellulare che possono essere ritenuti alla base di un "rimodellamento" delle vie aeree. A questo sarebbe strettamente correlato l'aumento del contenuto aereo (*air trapping* o enfisema) che potrebbe essere legato ad fibrosi peribronchiale, piuttosto che dovuto ad una malattia distruttiva del parenchima polmonare di per sé. Si riconosce invece

tale meccanismo patogenetico nell'enfisema associato al deficit di alfa 1-antitripsina che è tipicamente centrolobulare (34).

In età pediatrica possono essere presenti anche malattie polmonari interstiziali. Esse comprendono un ampio, eterogeneo gruppo di condizioni polmonari per lo più rare che causano distruzione delle pareti alveolari e perdita di unità funzionali alveolo-capillari a cui conseguono malattia polmonare restrittiva ed alterazione degli scambi gassosi. Le più frequenti in età pediatrica sono rappresentate certamente dalle interstiziopatie successive alle infezioni e si propongono come sequele a lungo termine. In particolare si ricorda l'importanza delle polmoniti da *adenovirus*, e da *cytomegalovirus*, ma sono stati riportati anche casi conseguenti ad infezione da virus influenzale, da micoplasma e da *chlamydia*. Anche in questi casi la radiografia del torace ha un ruolo importante per svelare la malattia (infiltrati reticolari, nodulari, reticolo-nodulari, aree di aumentata densità a vetro smerigliato, aspetto a nido d'api), anche se i *pattern* evidenziati non sono specifici e le anomalie radiologiche sono scarsamente correlate con l'impegno clinico e funzionale.

Per quanto riguarda il reflusso gastro-esofageo va detto che, sebbene esso possa essere dimostrato nei bambini con malattia polmonare interstiziale e altri disordini respiratori cronici, è spesso difficile determinare se sia realmente causa, esacerbante o invece sia semplice conseguenza della malattia polmonare stessa.

In conclusione, il radiogramma standard eseguito sulla base delle indicazioni offerte dall'esame clinico ed eventualmente una valutazione più approfondita mediante l'impiego della HRCT possono risultare determinanti nell'inquadramento e nel monitoraggio a lungo termine delle broncopneumopatie recidivanti e croniche dell'infanzia e dell'adolescenza.

Bibliografia

1. Ronchetti R. *Le infezioni respiratorie ricorrenti-ricidivanti: definizione e considerazioni introduttive.* Riv Broncopneum Ped 1994; 6: 3-40.
2. Grenier P, Cordeau MP, Beigelman C. *High-resolution computed tomography of the airways.* J Thorac Imaging 1993; 8: 213-229.
3. Kuhn SP. *High resolution computed tomography of pediatric pulmonary parenchymal disorders.* Radiol Clin N Am 1993; 31: 533-551.
4. Loubeyre P, Paret M, Revel D, et al. *Thin-section CT detection of emphysema associated with bronchiectasis and correlation with pulmonary function tests.* Chest 1996; 109: 360-365.
5. McGuinness G, Naidich DP, Leitman BS, McCauley DI. *Bronchiectasis: CT evaluation.* AJR 1993; 160: 253-259.
6. Kornreich L, Horev G, Ziv N. *Bronchiectasis in children: assessment by CT.* Pediatr Radiol 1993; 23: 120-123.
7. Herman M, Michalkova K, Kopriva F. *High-resolution CT in assessment of bronchiectasis in children.* Pediatr Radiol 1993; 23: 376-379.
8. Orentein DM, Bowen AD. *Cystic fibrosis: clinical update for Radiologists.* Radiol Clin N Am 1993; 33: 617-630.
9. Bhalla M, Turcios N, Aponte V, et al. *Cystic fibrosis: scoring system with thin-section CT.* Radiology 1991; 179: 783-788.
10. Maffessanti M, Candusso M, Brizzi F, Piovesana F. *Cystic fibrosis in children: HRCT findings and distribution of disease.* J Thor Imag 1996; 11: 27-38.
11. MacLusky I, Levison H. *Cystic Fibrosis.* In: Chernick V, Boat TF. "Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children", 6th Edition. Philadelphia: WB Saunders 1998; 838-882.
12. Wilfond DS, Taussig LM. *Cystic Fibrosis: general overview.* In: Taussig LM, Landau LI. "Pediatric Respiratory Medicine". St. Louis: Mosby 1999; 982-990.
13. Afzelius BA. *A human syndrome caused by immotile cilia.* Science 1976; 193: 317-319.
14. Eliasson R, Mossberg B, Camner P, Afzelius BA. *The immotile cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male infertility.* N Engl J Med 1977; 297: 1-6.
15. Rossman CM, Forrest JB, Ruffin RE, Newhouse MT. *Immotile cilia syndrome in individuals with and without Kartagener's syndrome.* Am Rev Respir Dis 1980; 121: 1011-1016.
16. Rossman CM, Newhouse MT. *Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management.* Pediatr Pulmonol 1988; 5: 36-50.
17. Pifferi M, Caramella D, Bartolozzi C, et al. *CT-guided radiolabelled aerosol studies for assessing pulmonary impairment in children with bronchiectasis.* Pediatric Radiology 2000; 30: 632-637.
18. Brown MA, Lemen RJ. *Bronchiectasis.* In: Chernick V, Boat TF. "Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children", 6th Edition. Philadelphia: WB Saunders 1998; 538-552.
19. Muller NL, Miller RR. *Diseases of the bronchioles: CT and Histopatologic Findings.* Radiology 1995; 196: 3-12.
20. Kuwano K, Matsuba K, Ikeda T, et al. *The diagnosis of mild emphysema. Correlation of computed tomography and pathology scores.* Am Rev Respir Dis 1990; 141: 169-178.
21. Gevenois PA, De-Vuyst P, de Maertelaer V, et al. *Comparison of computed density and microscopic morphometry in pulmonary emphysema.* Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 187-192.
22. Marti-Bonmati L, Ruiz Perales F, Catala F, et al. *CT findings in Swyer-James syndrome.* Radiology 1989; 172: 77-78.
23. Barbato A, Mastrorilli MP, Sebastianelli A, et al. *Inhalation of foreign bodies in children. Report of 20 cases.* IJP 1983; 9: 215.
24. Magnon F, Mesurolle B, Chambellan A, et al. *Foreign body granuloma mimicking bronchial tumour. Aspects in X-ray computed tomography with views by virtual endoscopy.* J Radiol 1997; 78: 1181.
25. Caramella D, Pifferi M, Lupi G, et al. *Distress respiratorio in età pediatrica da corpi estranei misconosciuti.* Riv Ital Broncopneumol Pediatr 1998; 2: 176-179.

- 26.** Cotton RT. *Foreign body aspiration*. In: Chernick V, Boat TF. "Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children", 6th Edition. Philadelphia: WB Saunders 1998; 601-607.
- 27.** Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, et al. *Asthma: a disease remodelling the airways*. Allergy 1992; 47: 3-11.
- 28.** Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al. *Asthma from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1720-1745.
- 29.** Paganin F, S neterre E, Chanez P, et al. *Computed tomography of the lungs in asthma: influence of disease severity and etiology*. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 110-114.
- 30.** Paganin F, Jaffuel D, Bousquet J. *Significance of emphysema observed on computed tomography scan in asthma*. Eur Respir J 1997; 10: 2446-2448.
- 31.** Biernacki W, Redpath AT, Best JJK, MacNee W. *Measurement of CT lung density in patients with chronic asthma*. Eur Respir J 1997; 10: 2455-2459.
- 32.** Newman KB, Lynch DA, Newman LS, et al. *Quantitative computed tomography detects air trapping due to asthma*. Chest 1994; 106: 105-109.
- 33.** Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. *Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics*. Lancet 1989; 1: 520-524.
- 34.** Netzel M, Kimberg K, Gwinn G, Townley R. *Alpha 1-antitrypsin Deficiency*. In: Tausig LM, Landau LI. "Pediatric Respiratory Medicine". St. Louis: Mosby 1999; 1206-1216.

Massimo Pifferi, Vincenzo Ragazzo

Fisiopatologia Respiratoria ed Allergologia - U.O. Pediatria 1

Dipartimento Medicina della Procreazione e dell'Età Evolutiva - Università di Pisa

L'analisi dell'attività ciliare nella patologia respiratoria cronica in età pediatrica

Analysis of ciliary motion in childhood chronic respiratory disease

Parole chiave: discinesia ciliare primaria; *brushing* nasale; microscopio ottico in contrasto di fase; movimenti patologici

Key words: *primary ciliary dyskinesia; nasal brushing; optical microscope equipped with differential interference contrast; pathological motion patterns*

Riassunto. L'analisi dell'attività ciliare deve essere proposta nei bambini con problemi respiratori cronici perché è l'unico modo per evidenziare le alterazioni primitive (Discinesia Ciliare Primaria, DCP) ma anche quelle secondarie nella rimozione del muco. Poiché le ciglia rivestono l'epitelio della mucosa respiratoria dalle cavità nasali fino ai bronchioli respiratori ed ogni cellula epiteliale porta sulla sua superficie apicale circa 250-300 ciglia, nel bambino è conveniente eseguire il prelievo dei campioni da analizzare a livello dei turbinati nasali inferiori, utilizzando uno spazzolino citologico.

Per una valutazione dell'attività ciliare dovrà essere presa in considerazione la frequenza del battito, il *pattern* motorio o l'assenza di movimento e gli aspetti morfologici evidenziati con microscopio ottico ad elevato ingrandimento in contrasto di fase esaminando la registrazione a velocità ridotta.

Nella DCP possono essere descritti movimenti patologici quali quello "a frullino", "a metronomo", "a cavaturaccioli", "di prensione dell'apice" e "di sottile tremolio".

Il tipo di movimento o la presenza di ciglia immobili viene giudicata significativa se è osservata in almeno il 40% dei campi microscopici.

Summary. *Analysis of ciliary motion must be performed in children with chronic respiratory disease since it is the only method to demonstrate congenital abnormalities (Primary Ciliary Dyskinesia, PCD) as well as secondary alterations of mucus clearance.*

Since cilia are present in the respiratory epithelium from nasal cavities to respiratory bronchioles, and each epithelial cell has about 250-300 cilia, in children it is preferable to obtain the samples from the lower turbinates by using a cytologic brush.

To evaluate ciliary motion beat frequency, motion pattern, immotile cilia, and morphological abnormalities have to be analyzed by using an optical microscope equipped with differential interference contrast and by evaluating the recording on slow-and-stop motion images.

In PCD the following pathological motion patterns can be described: "eggbeater", "metronome", "corkscrew", "grabbing-type" and "quivering". The motion pattern and the presence of immotile cilia is deemed significant if it is seen in at least 40% of observation fields.

Corrispondenza: Dott. Massimo Pifferi, Fisiopatologia Respiratoria ed Allergologia - U.O. Pediatria I, Dipartimento Medicina della Procreazione e dell'Età Evolutiva - Università di Pisa - Via Roma 67, 56126 Pisa; e-mail: m.pifferi@med.unipi.it

Le infezioni respiratorie rappresentano l'evento più comune in età pediatrica ed abitualmente vanno incontro a guarigione completa. Tuttavia, in una minoranza di soggetti la presenza di microrganismi particolarmente aggressivi, di meccanismi difensivi deficitari oppure l'istituzione di un trattamento inappropriato possono favorire lo sviluppo di danni permanenti che determinano il persistere di sintomi respiratori tra cui una tosse di tipo produttivo ad andamento cronico (1).

In tali soggetti la permanenza di un reperto ascoltoratorio toracico caratterizzato da rantoli fini localizzati sempre nella stessa sede può esprimere la

presenza di sottostanti alterazioni anatomiche di tipo bronchiectasico (1). Pur non conoscendone la reale incidenza nella popolazione generale, è possibile ritenere, secondo quanto riferito da Nikolaizik e Warner, che tali alterazioni non si osservino in più dell'1% dei bambini con problemi respiratori se si esclude la fibrosi cistica (1).

L'identificazione delle altre cause di bronchiectasie ha permesso di rilevare il ruolo preminente dei deficit immunologici (primari e secondari), ma anche l'importanza dei difetti ciliari primari, delle malformazioni congenite (vascolari, adenomatosi cistica, amartomi, broncomalacia, Sindrome di

Williams-Campbell) (2-8) e della inalazione di corpi estranei (9), sebbene in una quota rilevante di casi non sia possibile stabilire alcun fattore predisponente. Allorché vengano dimostrate bronchiectasie risulta quindi importante accertare la presenza di eventuali cause sottostanti, poiché solo così, spesso, sarà possibile intraprendere un trattamento adeguato. In particolare, secondo quanto recentemente rilevato da alcuni autori (10), la Discinesia Ciliare Primaria (DCP) avrebbe un'elevata incidenza (5,6%) nei bambini con infezioni respiratorie ricorrenti per cui è stata proposta in questi casi una valutazione sistematica delle cellule ciliate della mucosa respiratoria.

L'importanza di giungere precocemente alla diagnosi di DCP è stata evidenziata anche dal monitoraggio longitudinale della funzione respiratoria di soggetti affetti da tale malattia (11): infatti è stato osservato un progressivo deterioramento funzionale, tanto maggiore quanto più tardiva è la diagnosi e quindi l'istituzione di un adeguato trattamento (Figure 1 e 2). L'analisi dell'attività ciliare dunque deve essere proposta nei bambini con problemi respiratori cronici perché è l'unico modo per evidenziare le alterazioni primitive, ma anche quelle secondarie nella rimozione del muco. Oggi sappiamo infatti che la *clearance* muco-ciliare può essere compromessa sia primitivamente, sia in

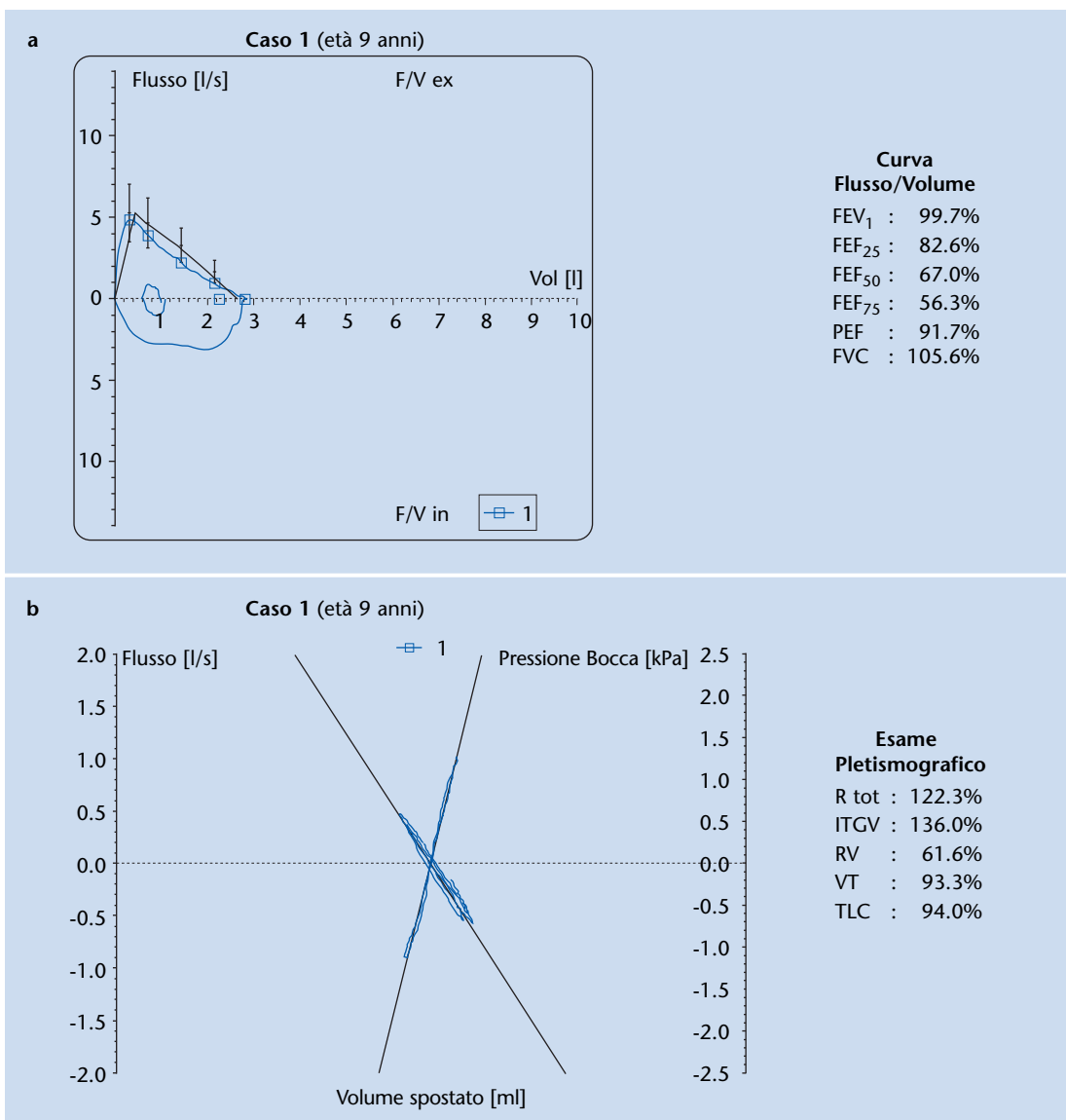


Figura 1 a, Curva F/V e b, Pletismografia corporea in una bambina con DCP diagnosticata precocemente.

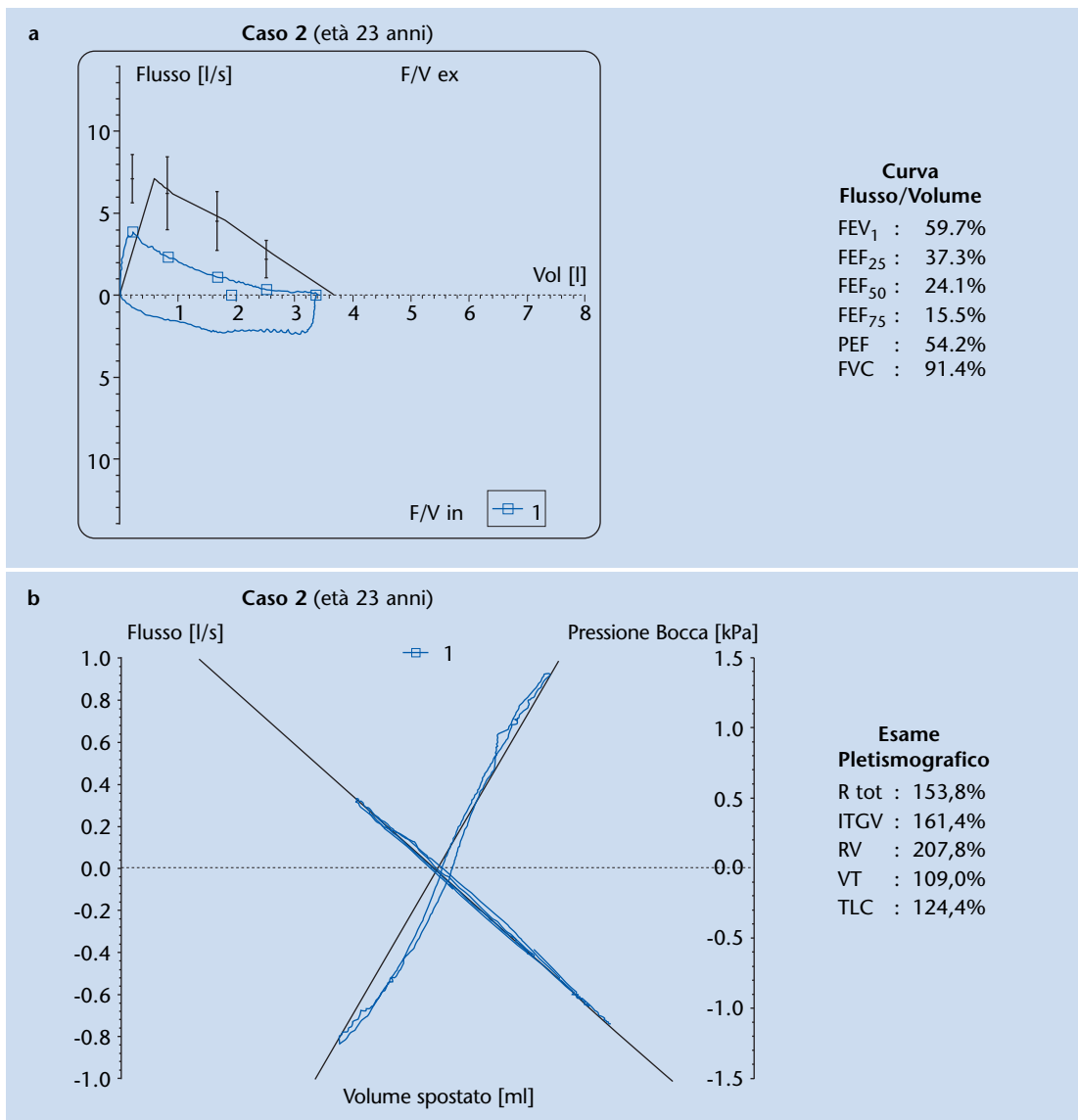


Figura 2 a, Curva F/V e b, Pletismografia corporea in una ragazza con DCP diagnosticata in epoca tardiva.

seguito all'esposizione ad agenti fisici o chimici (danno ossidativo, danno da inquinanti) (12-16) e biologici (*noxae* infettive quali il Virus Respiratorio Sinciziale, l'*Adenovirus* tipo 1, l'*Haemophilus influenzae*, la *Clamidia pneumoniae*) (17-22). È necessario comunque ricordare che, anche se i bambini con DCP possono non presentare sintomi alla nascita, spesso nel periodo neonatale si evidenzia un *distress* respiratorio oppure si hanno infezioni ricorrenti delle basse vie aeree. Si va così sviluppando una bronchite cronica che nel corso degli anni può progredire verso la formazione di bronchiectasie (23). Abitualmente si riscontrano infezioni delle vie aeree superiori spesso con sinusite cronica,

poliposi nasale ed otite media ricorrente. In questi bambini di solito sono presenti secrezioni mucopurulente nelle cavità nasali e sono comuni ostruzione nasale, rinorrea, gocciolamento di muco dalle fosse nasali posteriori sul retrofaringe ed anosmia. I maschi sono quasi sempre infertili, avendo un numero normale di spermatozoi ma con alterata motilità. Le femmine invece abitualmente sono fertili nonostante il possibile danno della funzione ciliare a livello delle tube di Falloppio (23). Com'è noto, inoltre, può aversi una malrotazione dei visceri interni con *destrocardia*, *situs inversus addominale* o *situs inversus totalis*. È stato suggerito che questo può essere dovuto alla perdita della

normale rotazione degli organi forse causata dalle ciglia embrionali durante la chiusura della cavità toracica ed addominale (24). La Sindrome di Kartagener, che nella descrizione originale comprendeva la triade sinusite cronica, bronchiectasie e *situs inversus totalis*, viene quindi oggi considerata un sottogruppo della DCP (25, 26). Le caratteristiche cliniche di questi soggetti tuttavia non differiscono da quelle riscontrate nei pazienti con bronchiectasie non dovute a difetti ciliari. Infatti, un recente studio che ne valutava comparativamente l'incidenza nei pazienti con infezioni respiratorie ricorrenti dovute alla DCP rispetto a quelle presentate nei pazienti senza DCP mostrava che solo alcune di esse differivano in maniera significativa. Tra queste erano comprese una storia di infezioni respiratorie ricorrenti nei fratelli, il *distress* respiratorio neonatale in bambini nati a termine senza altra causa apparente, l'otite media cronica, la sordità, la rinite purulenta, la malrotazione di

organi. L'incidenza di collasso lobare, sinusite, bronchiectasie, dita "a bacchetta di tamburo" e tosse non era invece significativamente diversa nei due gruppi (Figura 3) (27).

Solo analizzando però il movimento delle ciglia respiratorie è possibile, come vedremo, dimostrare quelle alterazioni che sono alla base delle manifestazioni cliniche riferite. Poiché le ciglia rivestono l'epitelio della mucosa respiratoria dalle cavità nasali fino ai bronchioli respiratori ed ogni cellula epiteliale porta sulla sua superficie apicale circa 250-300 ciglia (26, 28), nel bambino è conveniente eseguire il prelievo dei campioni da analizzare a livello dei turbinati nasali inferiori, utilizzando uno spazzolino citologico (Microvasive, Milford, Ma, USA) come descritto da Rutland e Cole (29). Infatti le alterazioni ultrastrutturali delle ciglia nasali correlano in maniera significativa con quelle bronchiali (30). I campioni prelevati vengono quindi messi in sospensione in 2 ml di un mezzo

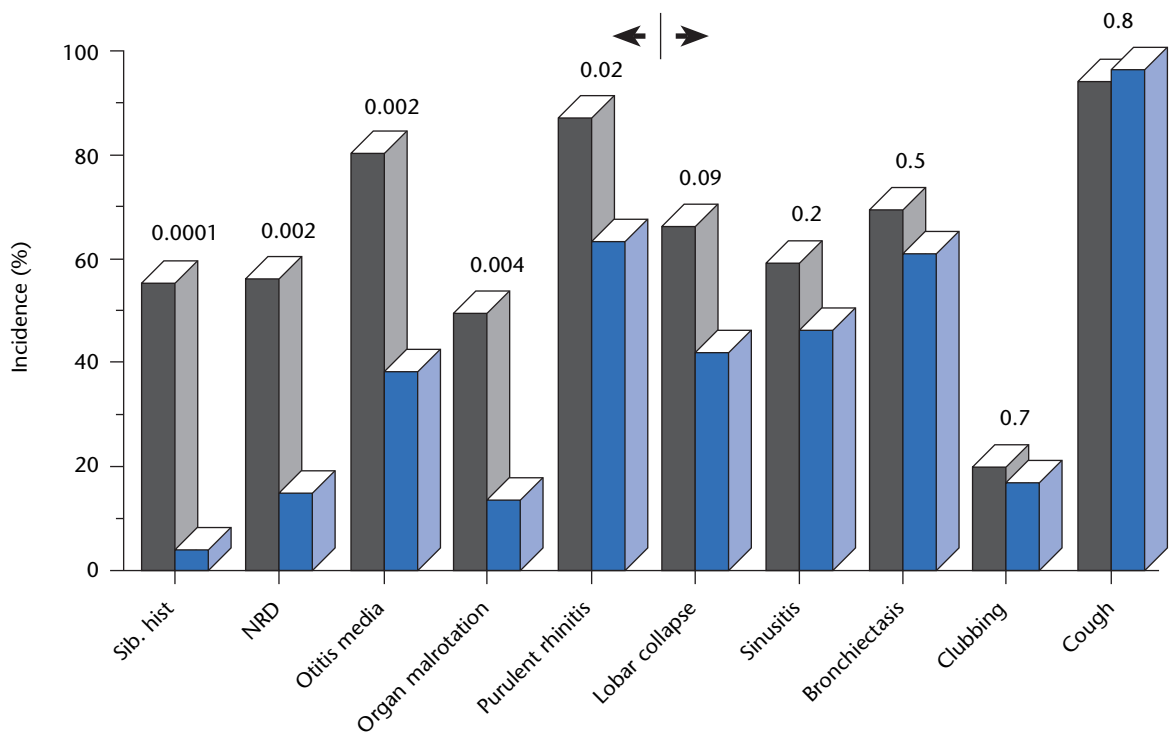


Figura 3 Incidenza delle manifestazioni cliniche in bambini affetti da infezioni respiratorie ricorrenti con DCP (barre scure) o senza DCP (barre chiare). Modificata da [27].

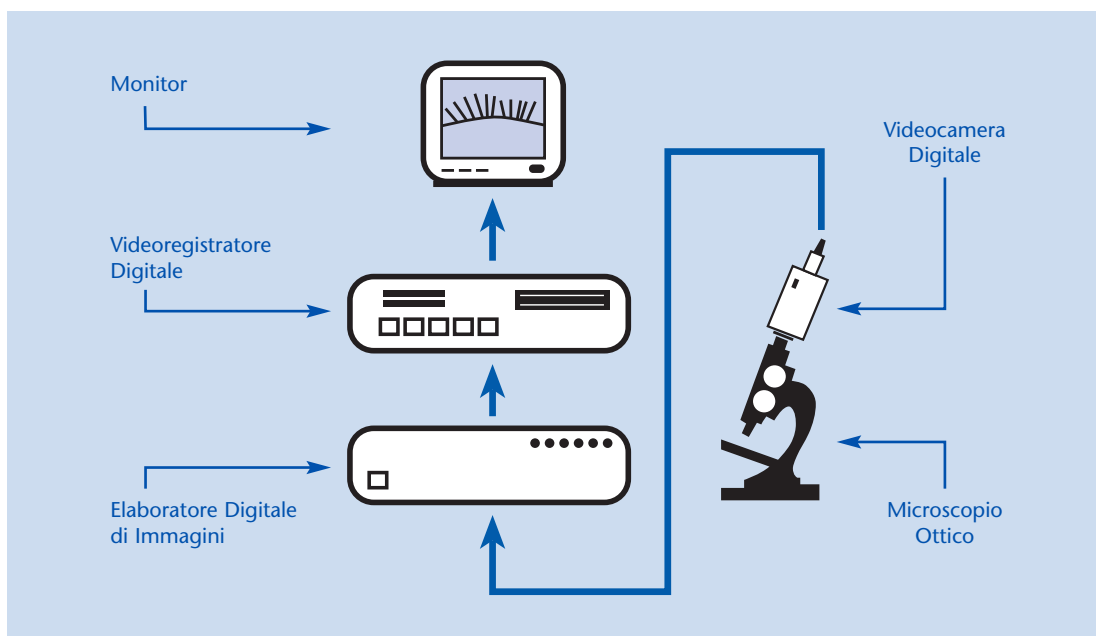


Figura 4 Strumentazione utilizzata per l'analisi dell'attività delle ciglia respiratorie in vitro.

di coltura (Medium 199) o in soluzione fisiologica per la immediata valutazione al microscopio ottico. Quindi si procede ad una blanda centrifugazione (1000 xg) per 1 minuto allo scopo di ottenere la sedimentazione del campione che sarà prelevato per l'osservazione diretta mediante una pipetta Pasteur. A questo scopo viene utilizzato un microscopio ottico (Diaplan Leitz, Leica, Wetzlar, Germany) dotato di contrasto interferenziale di fase secondo Nomarsky e di obiettivo ad immersione ($\times 100$). Il microscopio è connesso con una videocamera digitale a colori (JVC, TK-C1380, Yokohama, Japan) che consente la ripresa in tempo reale delle immagini ad elevato ingrandimento. Queste vengono inviate ad un elaboratore digitale (Magic DaVE 3D Digital Effects System, Snell & Wilcox, Saffron Walden, UK) che consente ad operatori esperti di migliorarne la qualità di visualizzazione, aumentando da $5-8 \mu\text{m}$ a $3-5 \text{ cm}$ le dimensioni delle ciglia sul monitor (JVC, TM-1500PS, Yokohama, Japan). Le immagini selezionate vengono archiviate mediante videoregistratore digitale (JVC, BR-D80E Digital S, Yokohama, Japan) ad una frequenza di 25 frames/sec per essere successivamente analizzate (Figura 4).

Per una valutazione dell'attività ciliare dovrà essere presa in considerazione la frequenza del battito, il *pattern* motorio o l'assenza di movimento e gli aspetti morfologici evidenziati in contrasto di

fase esaminando la registrazione a velocità ridotta. Per ogni campione sarà opportuno analizzare almeno 50 cellule, singole o in piccoli gruppi, perché l'interpretazione sia affidabile (25, 31). In condizioni normali, nel nostro laboratorio, il battito ciliare presenta una frequenza di $12.1 \pm 1.8 \text{ Hz}$, determinata in non meno di 25 campi microscopici scelti in maniera randomizzata in ogni campione. Nella DCP abitualmente si osservano valori di frequenza del battito ciliare estremamente bassi se non addirittura la presenza esclusiva di ciglia immobili (25, 31). Il battito ciliare di norma è asimmetrico e caratterizzato da un movimento in avanti su un piano verticale, relativamente rigido, che produce uno spostamento di muco, seguito da un movimento di ritorno con una flessione su un piano verticale ed orizzontale che non riporta il muco all'indietro (Figura 5). Le ciglia della stessa fila battono in modo sincrono, mentre quelle della fila contigua battono nella stessa direzione (allineamento ciliare) e nella medesima fase (coordinazione ciliare), ma con un piccolo ritardo che fa assumere al movimento la tipica forma ad onda metacronale, paragonata ad un campo di grano mosso dal vento (Figura 6) (32).

Nella DCP possono invece essere descritti altri tipi di movimento (26):

1. "a frullino", caratterizzato da una rotazione

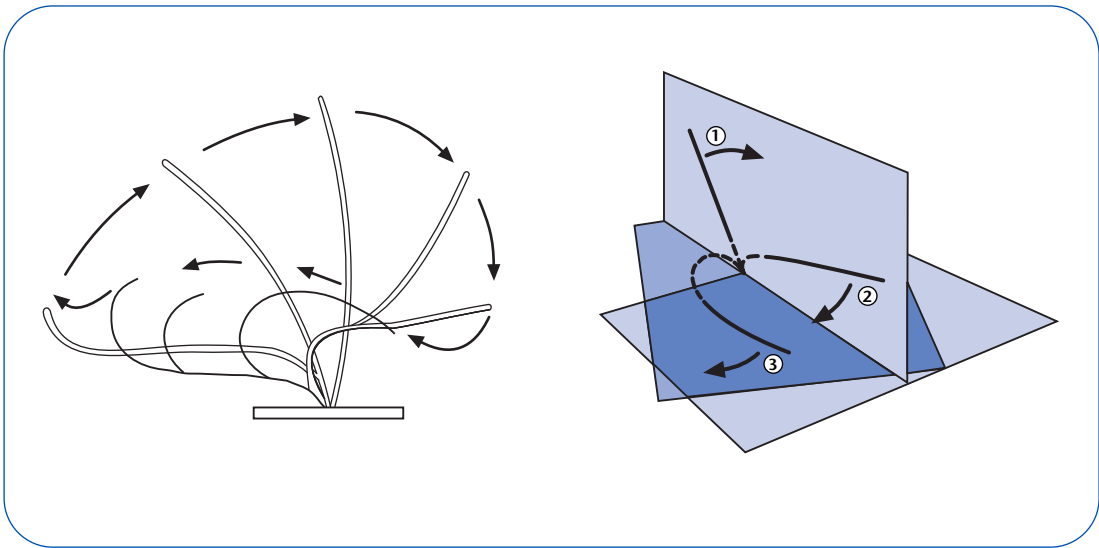


Figura 5 Battito ciliare normale: movimento a frusta. Modificata da [32].

multiplanare della porzione intermedia del ciglio, mentre l'apice e la base rimangono sullo stesso piano (Figura 7);

2. "a metronomo", caratterizzato da un movimento di tipo vibratorio in cui le ciglia sono piegate solo nella loro metà distale ed appaiono rigide muovendosi attraverso un arco piuttosto ristretto su piani differenti (Figura 7);

3. "a cavaturaccioli", caratterizzato da una rotazione bifasica a spirale lungo l'asse maggiore del

ciglio con rotazione nelle porzioni distale e prossimale del ciglio stesso a differenti velocità e movimento dell'apice e della base attraverso un arco ristretto (Figura 7);

4. "di prensione dell'apice", un particolare tipo di movimento in cui il ciglio è piegato nel mezzo con metà inferiore rigida che si muove attraverso un arco molto stretto e metà superiore piegata e caratterizzata da un movimento di piegamento limitato seguito da un movimento di rialzamento in avanti.

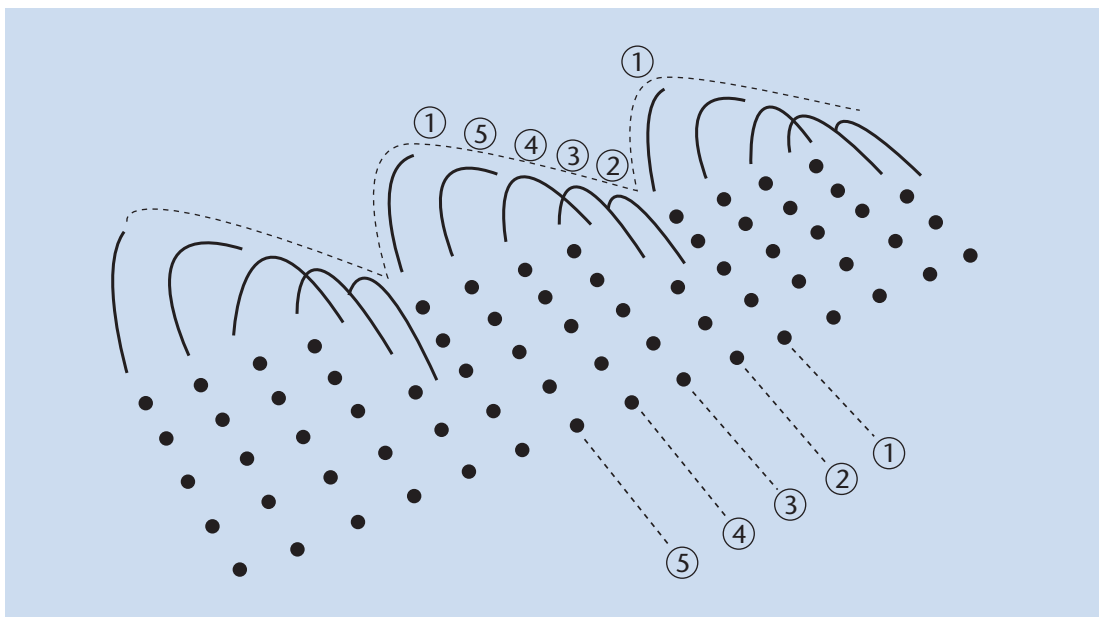


Figura 6 Battito ciliare normale: onda metacronale. Modificata da [32].

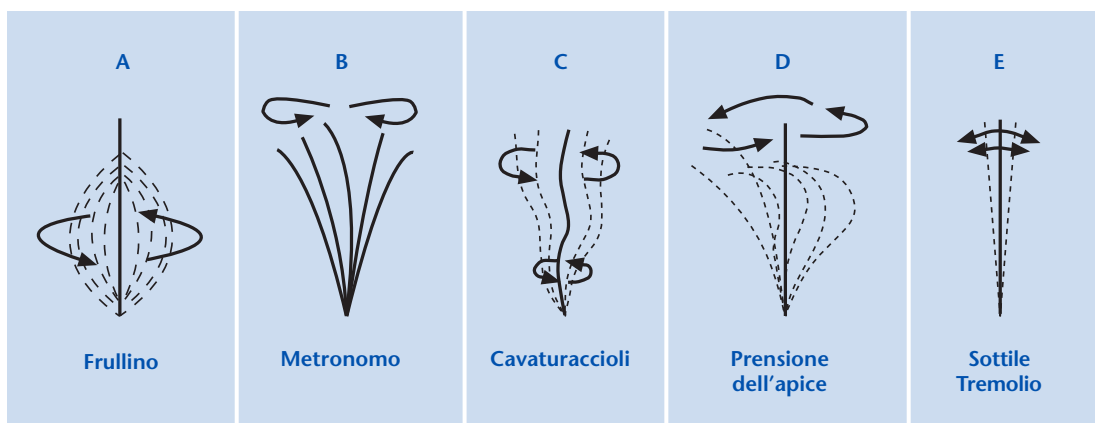


Figura 7 Movimenti patologici.

Non vi è metacronicità delle onde e il movimento avviene su piani diversi tra ciglia adiacenti (Figura 7);

5. “di sottile tremolio”, caratterizzato da un movimento ciliare che conserva il proprio sincronismo, ma è ad alta frequenza e di ampiezza molto ridotta (Figura 7) (33).

Il tipo di movimento o la presenza di ciglia immobili viene giudicata significativa se è osservata in almeno il 40% dei campi microscopici (34).

Tali difetti del *pattern* motorio sono stati correlati, anche se non sempre, con specifiche alterazioni della ultrastruttura ciliare (Tabella 1) (26). La DCP può essere inoltre dovuta alla perdita del normale orientamento ciliare con alterazione dei reciproci rapporti tra le ciglia che determina la mancanza di sincronismo nel movimento (26, 35).

Per quanto riguarda gli aspetti morfologici evidenziati in contrasto di fase assume importanza il rilievo di ciglia ispessite e di aree di disepitelizzazione

che di solito depone per la presenza di una flogosi in atto (26).

L'analisi dell'attività e della morfologia ciliare eseguite con la metodica descritta offrono indubbi vantaggi, quali la possibile applicazione nel bambino non collaborante, la scarsa invasività dell'indagine e la buona riproducibilità dei risultati, tuttavia queste richiedono una strumentazione costosa ed appaiono tecnicamente complesse per cui debbono essere eseguite da operatori esperti. Esiste comunque sempre il rischio di incorrere in errori interpretativi per la possibile focalità delle alterazioni (Tabella 2). L'analisi dell'attività ciliare *in vitro* con la valutazione della frequenza del battito ciliare e del *pattern* di movimento riveste un ruolo importante nell'iter diagnostico della DCP. Infatti, se è vero che può rappresentare un'indagine di *screening* allo scopo di individuare i soggetti da sottoporre ad esame morfometrico ultrastrutturale delle ciglia

Tabella 1 Correlazione tra ultrastruttura e difetto di movimento ciliare. Da [26].

Ultrastruttura ciliare	Difetto di motilità
Assenza dei bracci di dineina	a) movimento a frullino b) movimento a metronomo
Difetto dei ponti radiali	movimento di rotazione a cavaturaccioli
Difetto di traslocazione	movimento di pressione dell'apice con base rigida
Ultrastruttura normale	sottile tremolio

Tabella 2 Analisi dell'attività ciliare: vantaggi e svantaggi.

Analisi dell'Attività Ciliare	
Vantaggi	Svantaggi
<ul style="list-style-type: none"> • Non limiti di età • Non collaborazione • Scarsa invasività • Buona riproducibilità 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispendiosa • Tecnicamente complessa • Strumentazione costosa • Possibile focalità delle alterazioni

dell'epitelio respiratorio, tale analisi è anche essenziale per giungere ad una diagnosi di certezza. A questo scopo nei soggetti con significative alterazioni del movimento ciliare, nei quali non siano dimostrabili anomalie ultrastrutturali patognomoniche per DCP, viene proposta la ripetizione dell'analisi dell'attività ciliare *in vitro* dopo un prolungato periodo di trattamento fisioterapico e farmacologico (36). La diagnosi di DCP potrà essere comunque confermata mediante indagini relative

al trasporto mucociliare *in vivo* (25) ed eventualmente attraverso la ripetizione dell'esame morfometrico ultrastrutturale su campioni prelevati a livello tracheo-bronchiale (Figura 8). Tuttavia, poiché esistono casi di DCP con ultrastruttura normale, è necessario ricordare che la diagnosi definitiva dovrà scaturire da una valutazione complessiva che tenga conto sia degli elementi clinici sia delle informazioni fornite dalle indagini di laboratorio.

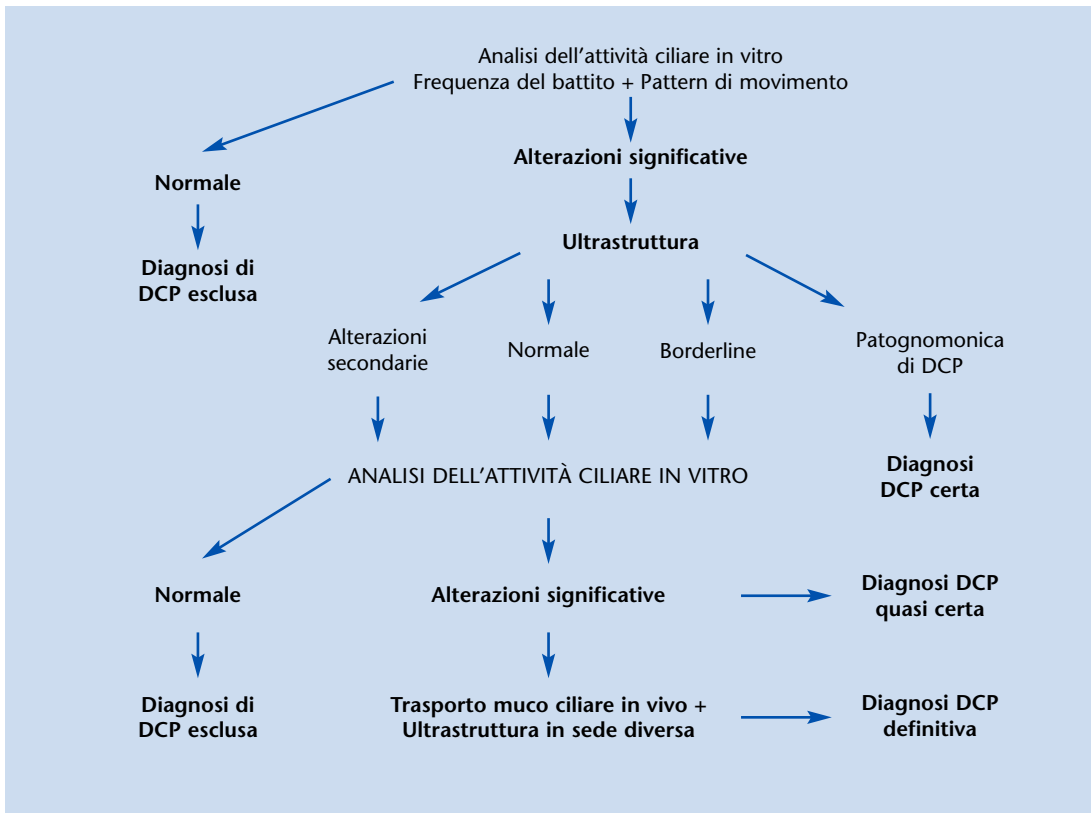


Figura 8 Iter diagnostico della DCP.

Bibliografia

1. Nicolaizik WH, Warner JO. Aetiology of chronic suppurative lung disease. *Arch Dis Child* 1994; 70: 141-142.
2. Clements BS, Warner JO. Pulmonary sequestration and related congenital bronchopulmonary-vascular malformations: nomenclature and classification based on anatomical and embryological considerations. *Thorax* 1987; 42: 401-408.
3. Williams HE, Campbell P. Generalized bronchiectasis associated with deficiency of cartilage in the bronchial tree. *Arch Dis Child* 1960; 35: 182-191.
4. Pinsky WW, Nihill MR, Mullins CE, et al. The absent pulmonary valve syndrome: considerations of management. *Circulation* 1978; 57: 159.
5. Buchdahl RM, Reiser J, Ingram D, et al. Ciliary abnormalities in respiratory disease. *Arch Dis Child* 1988; 63: 238-243.
6. Wayne KS, Taussig LM. Probable familial congenital bronchiectasis due to cartilage deficiency (Williams-Campbell syndrome). *Am Rev Respir Dis* 1976; 114: 15-22.
7. Chipps BE, Talamo RL, Windelstern JA. IgA deficiency, recurrent pneumonias, and bronchiectasis. *Chest* 1978; 73: 519-526.
8. Oxelius V, Laurell A, Lindquist B, et al. IgG subclasses in selective IgA deficiency: importance of IgG2-IgA deficiency. *N Engl J Med* 1981; 304: 1476-1477.
9. Aytac A, Yurdakul Y, Ikizler C, et al. Inhalation of foreign bodies in children. Report of 500 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977; 74: 145-151.
10. Chapelin C, Coste A, Reinert P, et al. Incidence of primary ciliary dyskinesia in children with recurrent respiratory diseases. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 854-858.
11. Ellerman A, Bisgaard H. Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 1997; 10: 2376-2379.
12. Burman WJ, Martin WJ. Oxidant-mediated ciliary dysfunction. Possible role in airway disease. *Chest* 1986; 89: 410-413.
13. Kantar A, Oggiano N, Giorgi PL, et al. Polymorphonuclear leukocyte-generated oxygen metabolites decrease beat frequency of human respiratory cilia. *Lung* 1994; 172: 215-222.
14. Feldman C, Anderson R, Kanthakumar K, et al. Oxidant-mediated ciliary dysfunction in human respiratory epithelium. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 1-10.
15. Pedersen M. Ciliary activity and pollution. *Lung* 1990; 168 (Suppl): 368-376.
16. Bayram H, Devalia JL, Khair OA, et al. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 771-782.
17. Wilson R, Sykes DA, Currie D, Cole PJ. Beat frequency of cilia from sites of purulent infection. *Thorax* 1986; 41: 453-458.
18. Wilson R, Cole PJ. The effect of bacterial products on ciliary function. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: S49-S53.
19. Tristram DA, Hicks W Jr, Hard R. Respiratory syncytial virus and human bronchial epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124: 777-783.
20. Bakaletz LO, Daniels RL, Lim DJ. Modeling adenovirus type 1-induced otitis media in the chinchilla: effect on ciliary activity and fluid transport function of eustachian tube mucosal epithelium. *J Infect Dis* 1993; 168: 865-872.
21. Fujihara K, Yamanaka N, Bernstein JM, et al. Morphologic and motility changes of nasal cilia in primary culture caused by *Haemophilus influenzae*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105: 452-457.
22. Shemer-Avni Y, Lieberman D. *Chlamydia pneumoniae*-induced ciliostasis in ciliated bronchial epithelial cells. *J Infect Dis* 1995; 171: 1274-1278.
23. Rutland J, de Longh R. Ciliary dysfunction. In: Taussig LM, Landau LI. "Pediatric respiratory medicine". St Louis, Missouri: Mosby Inc 1999; 1171-1178.
24. Afzelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 1976; 193: 317-319.

- 25.** Rossman CM, Newhouse MT. *Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management*. *Pediatr Pulmonol* 1988; 5: 36-50.
- 26.** Schidlow DV. *Primary ciliary dyskinesia (the immotile cilia syndrome)*. *Ann Allergy* 1994; 73: 457-469.
- 27.** Rutland J, Morgan L, Waters KA, et al. *Diagnosis of primary ciliary dyskinesia*. In: Baum GL, Priel Z, Liron N, et al. (eds). "Cilia, mucus and mucociliary interactions". New York: Marcel Dekker 1998; 407-428.
- 28.** Meeks M, Bush A. *Primary Ciliary Dyskinesia (PCD)*. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 307-316.
- 29.** Rutland J, Cole PJ. *Non-invasive sampling of nasal cilia for measurement of beat frequency and study of ultrastructure*. *Lancet* 1980; ii: 564-565.
- 30.** Verra F, Fleury-Feith J, Boucherat M, et al. *Do nasal ciliary changes reflect bronchial changes? An ultrastructural study*. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 908-913.
- 31.** Rossman CM, Lee RMKW, Forrest JB, Newhouse MT. *Nasal ciliary ultrastructure and function in patients with primary ciliary dyskinesia compared with that in normal subjects and in subjects with various respiratory diseases*. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 161-167.
- 32.** Jorissen M, Bertrand B, Eloy P. *Ciliary dyskinesia in the nose and paranasal sinuses*. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1997; 51: 353-366.
- 33.** Pedersen M. *Specific types of abnormal ciliary motility in Kartagener's syndrome and analogous respiratory disorders. A quantified microphoto-oscillographic investigation of 27 patients*. *Eur J Respir Dis* 1983; 64 (Suppl. 127): 78-90.
- 34.** Rossman CM, Forrest JB, Lee RMKW, Newhouse MT. *The dyskinetic cilia syndrome. Ciliary motility in immotile cilia syndrome*. *Chest* 1980; 78: 580-582.
- 35.** Rutman A, Cullinan P, Woodhead M, et al. *Ciliary disorientation: a possible variant of primary ciliary dyskinesia*. *Thorax* 1993; 48: 770-771.
- 36.** Pifferi M, Cangiotti AM, Ragazzo V, et al. *Primary ciliary dyskinesia: diagnosis in children with inconclusive ultrastructural evaluation*. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12: 274-282.

Angela M. Cangiotti

U.O. di Microscopia Elettronica - Dipartimento di Patologia - Azienda Ospedaliera "Umberto I" - Ancona (Direttore Prof. Saverio Cinti)

L'esame morfometrico ultrastrutturale delle ciglia dell'epitelio respiratorio

Morphometric ultrastructural analysis of the cilia of the respiratory tract epithelium

Parole chiave: discinesia ciliare primitiva, discinesia ciliare secondaria, Sindrome di Kartagener, dineina, tubulina, ultrastruttura

Key words: *primary ciliary dyskinesia, secondary ciliary dyskinesia, Kartagener's syndrome, dynein, tubulin, ultrastructure*

Riassunto. La Discinesia Ciliare Primitiva (DCP) è una patologia congenita clinicamente ed ultrastrutturalmente eterogenea, dovuta ad alterazioni della struttura e/o della funzione delle ciglia con conseguente deficit del trasporto muco-ciliare e comparsa di diversi quadri di patologia respiratoria. La diagnosi di DCP deve essere fatta attraverso il confronto tra un accurato esame clinico e lo studio funzionale ed ultrastrutturale delle ciglia.

Il presente articolo riassume le principali conoscenze riguardanti la biologia molecolare delle ciglia e, attraverso la revisione della letteratura e l'esperienza dell'Autore, puntualizza il ruolo diagnostico della microscopia elettronica, in particolare nella diagnosi differenziale tra alterazioni ciliari congenite ed acquisite.

Summary. *Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) is a congenital, clinically and ultrastructurally heterogeneous disease due to abnormal structure and/or function of cilia, with impaired mucociliary transport leading to several respiratory disorders. PCD can be diagnosed by the combination of thorough clinical examination with functional and ultrastructural analysis of the cilia.*

This article summarizes the main scientific knowledge about molecular biology of the cilia and, from the literature review and Author's experience, clarifies the diagnostic role of electron microscopy in distinguishing between acquired and genetically determined ciliary abnormalities.

Corrispondenza: Dott.ssa Angela Maria Cangiotti - U.O. di Microscopia Elettronica - Azienda Ospedaliera "Umberto I" - c/o Facoltà di Medicina e Chirurgia - via Tronto 10/A - 60020 Torrette di Ancona (AN); e-mail: cangiotti@mta01.unian.it

Ultrastruttura e funzione delle ciglia dell'epitelio respiratorio

L'epitelio ciliato riveste la mucosa in tutte le varie porzioni delle vie respiratorie compresi i seni paranasali, la tuba uditiva e l'orecchio medio.

Attività ciliare e muco bronchiale costituiscono un'unità funzionale detta **clearance muco-ciliare** che contribuisce alle difese dell'apparato respiratorio in quanto meccanismo responsabile del normale trasporto del muco e della conseguente eliminazione dalle vie respiratorie di particelle di polvere, cellule morte, batteri inalati ed in esso inglobati e quant'altro possa danneggiare il processo respiratorio. Condizioni essenziali per un'efficace **clearance muco-ciliare** sono la composizione ottimale del muco (glicoproteine, proteoglicani e lipidi) ed una valida attività ciliare. In condizioni normali il muco (1-5) si organizza sulla superficie delle vie aeree in

2 strati a diversa viscosità, che vengono spostati verso l'orofaringe dal movimento delle ciglia presenti all'apice delle cellule dell'epitelio respiratorio. Le **ciglia** sono sottili appendici filiformi del diametro di 250 nm e di lunghezza tra i 6 e i 10 μ presenti a questo livello con una densità di $10^9 / \text{cm}^2$, pari a circa 200 ciglia per cellula ciliata (Figura 1) (3). In sezione trasversale il ciglio appare costituito da una complessa struttura centrale detta **assonema**, formata da 9 coppie periferiche di microtubuli + 2 microtubuli centrali singoli. Tale nucleo centrale è immerso nella matrice citoplasmatica, a sua volta delimitata da una membrana che rappresenta un'estroflessione della membrana plasmatica della cellula (Figura 2).

I **microtubuli** (Figura 3) (3) sono lunghi tubi cavi di natura proteica del diametro esterno di 25 nm, sono formati da dimeri della **tubulina**, polipeptide

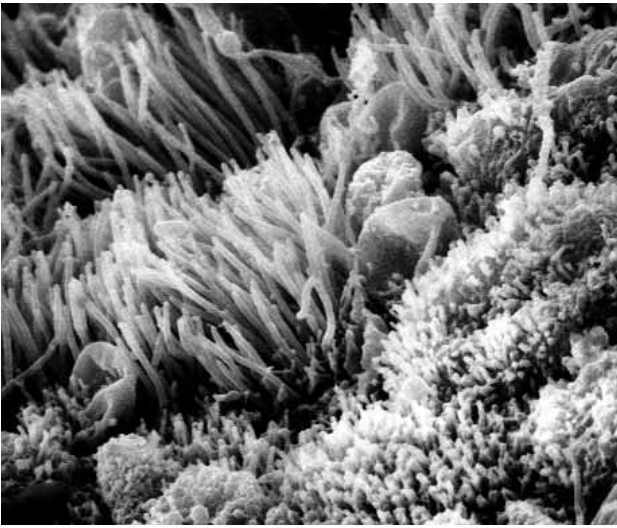


Figura 1 Micrografia elettronica a scansione (SEM) di cellule ciliate di mucosa bronchiale umana. ME 11500X

presente in forma di subunità globulari (α e β), ciascuna composta da circa 450 aminoacidi. I dimeri di tubulina (α e β) allineati in successione formano dei protofilamenti i quali si affiancano e si dispongono intorno ad una cavità centrale dando origine

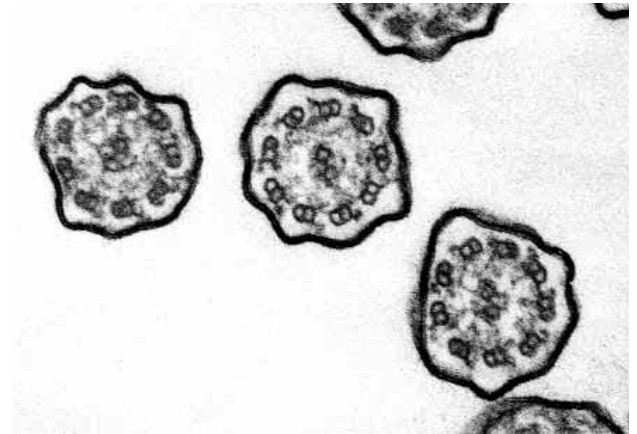


Figura 2 Micrografia elettronica a trasmissione (TEM) di sezioni trasversali di ciglia di mucosa nasale umana ad ultrastruttura normale. ME 165600X

ai microtubuli. Nei protofilamenti i dimeri α e β sono sfalsati tra loro in modo che la tubulina α di un dimerico è in contatto con la tubulina β di quello vicino. Ogni coppia periferica di microtubuli è costituita da una subfibra A e da una subfibra B. La subfibra A è un microtubulo completo che in sezione trasversale è formato da 13 protofilamenti, la

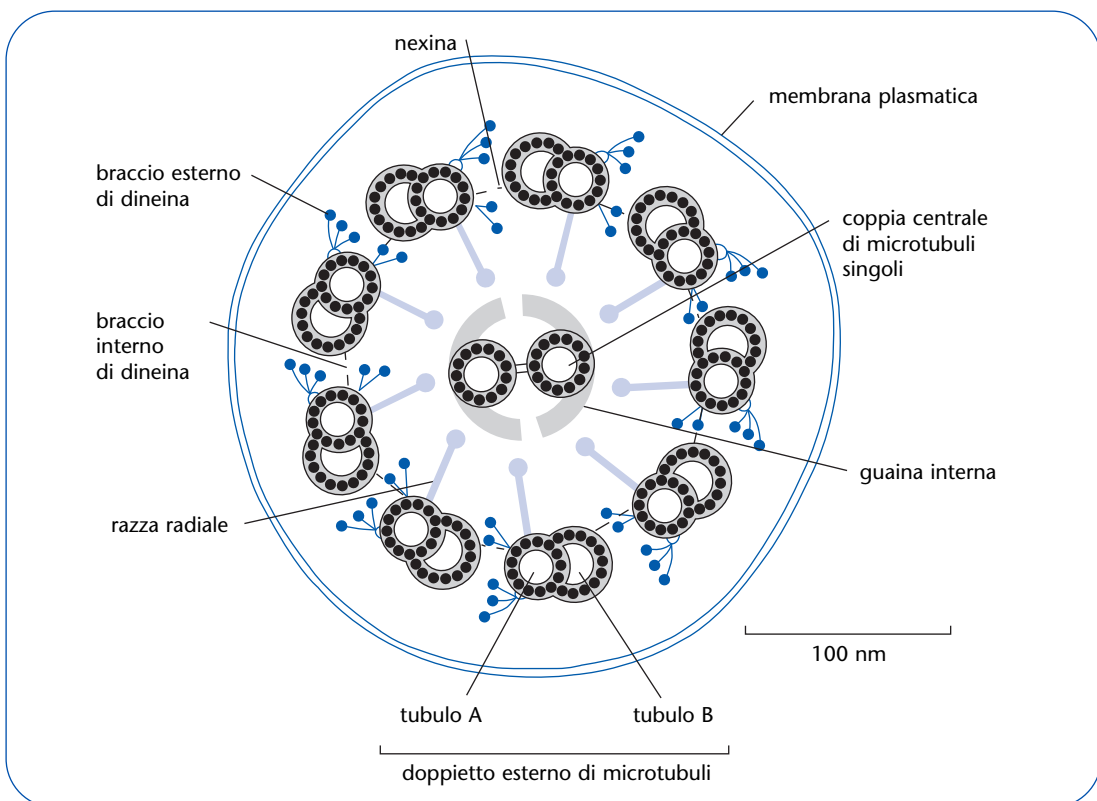


Figura 3 Schema di un ciglio in sezione trasversale in cui si può osservare la disposizione dei microtubuli e le varie proiezioni che li collegano fra loro a intervalli regolari lungo l'assonema. Modificato da [3].

subfibra B è un microtubulo incompleto ed è formato da 11 protofilamenti. I microtubuli centrali sono anch'essi formati da 13 protofilamenti di tubulina.

Il processo che porta alla formazione dei microtubuli *in vitro* avviene spontaneamente in presenza di GTP, mentre *in vivo* esistono centri di organizzazione che forniscono una base da cui i microtubuli possono accrescersi: i **corpuscoli basali**, che agiscono come stampo per disporre i microtubuli a coppie con il *pattern* 9+2.

Il corpuscolo basale è una struttura cilindrica posta nella porzione apicale del citoplasma della cellula ciliata che contiene un anello di 9 triplette di microtubuli (A, B, C) ed ogni tripletta contiene un microtubulo completo (A) fuso con altri due incompleti (B e C). I microtubuli periferici dell'assonema si continuano in quelli del corpuscolo basale e a questo livello, a ciascuna coppia si aggiunge un terzo microtubulo incompleto, mentre si ha l'arresto della coppia centrale 1 μ sopra la superficie cellulare (2-3). Come nell'assonema, anche nel corpuscolo basale esistono legami proteici di stabilizzazione, in particolare tra la subfibra A di una tripletta e la subfibra C di quella vicina. Inoltre un "basal foot" si proietta dal corpuscolo basale nella direzione del battito ciliare (Figura 4).

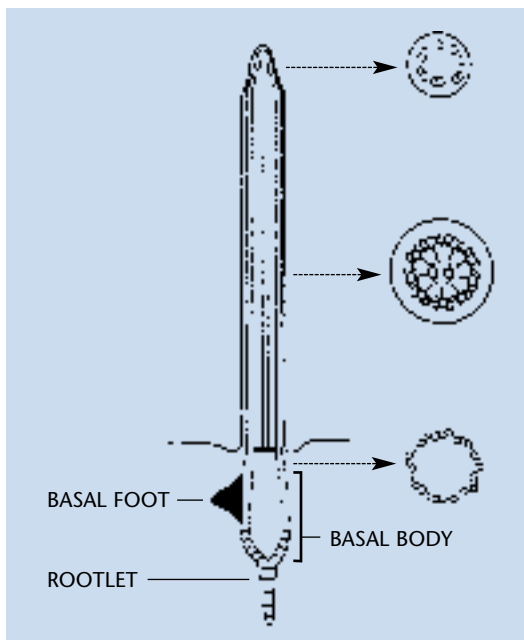


Figura 4 Rappresentazione schematica di una sezione longitudinale di ciglio, dove sono mostrate le variazioni della composizione microtubulare a livello apicale, intermedio e basale. Modificato da [7].

L'assetto 9+2 dei microtubuli dell'assonema si modifica anche nella porzione apicale del ciglio dove le coppie periferiche perdono progressivamente un microtubulo (subunità B) ed altre strutture quali, ad esempio, la coppia centrale ed i bracci di dineina (Figura 4) (6-7).

I microtubuli che compongono l'assonema vengono stabilizzati da proteine (MAPs: Microtubule Associated Proteins - Figura 3) (2, 3, 5), la più conosciuta delle quali è la **dineina**. Le molecole di dineina sono organizzate a formare coppie di bracci, interno ed esterno che, in senso antiorario se osservati dalla base del ciglio, sporgono dalla subfibra A di una coppia verso la subfibra B della coppia adiacente ad intervalli regolari di 24 nm. Nell'assonema la dineina costituisce un grande complesso macromolecolare composto da 9-12 subunità di dimensioni diverse. Il braccio esterno, correlato con la frequenza del battito, è formato da 2 subunità α e β , catene pesanti (450.000-400.000 D) che possiedono attività ATPasica e formano le teste globulari del complesso, da 2 o più catene intermedie e da 4-8 subunità più piccole, le catene leggere, che determinano l'ancoraggio del complesso dineinico alla superficie del microtubulo della subfibra A (Figura 5). I bracci interni di dineina, che invece influenzerebbero la

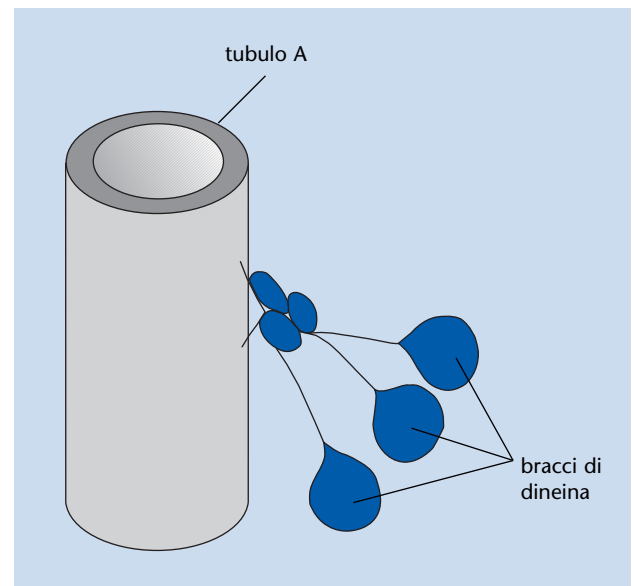


Figura 5 La dineina è un grande aggregato proteico (quasi due milioni di dalton) composto da 9-12 catene polipeptidiche. La base della molecola si lega fortemente ad un tubulo A fuori del controllo dell'ATP, mentre le grandi teste globulari possiedono un sito di legame dipendente dall'ATP per un secondo microtubulo. Modificato da [3].

forma del battito, hanno una struttura di base essenzialmente simile a quella degli esterni, ma sembrano esistere in tre distinti tipi che contengono isomeri diversi di dineina (I1, I2 e I3) (3, 5). Altre proteine accessorie sono la **tectina** (3) simile ai filamenti intermedi, di 2-3 nm di diametro, che scorre internamente ai microtubuli tra le molecole di tubulina e sembra che contribuisca a formare la parete condivisa tra le subfibre A e B stabilizzandone la struttura; la **nexina** che, a intervalli di 86 nm, forma legami dalla subfibra A alla subfibra B delle coppie periferiche di microtubuli, simili a fasce intorno all'intero assonema paragonabili ai cerchi di un barile; i **raggi** o **razze** o **ponti radiali** che sporgono da ogni coppia con una periodicità di 29 nm e terminano con la parte globulare vicino alla guaina interna, connettendo quindi ogni coppia periferica a quella centrale ed infine la **guaina interna** formata da sottili bracci proteici, le proiezioni, che sporgono con una periodicità di 14 nm dal paio di tubuli centrali e sono incurvati intorno ad essi quasi a formare un anello. Quest'ultima interviene, con i raggi e la nexina, nella regolazione della forma del battito ciliare (3, 5). Si è dimostrato sperimentalmente che il movimento ciliare non dipende dalla presenza del corpuscolo basale né da quella della membrana plasmatica poiché l'assonema isolato è in grado di compiere movimenti di flessione se immerso in una soluzione salina contenente ATP e ioni magnesio oppure calcio. Inoltre esponendo assonemi isolati

all'azione di enzimi proteolitici che distruggono nexina e ponti radiali, ma lasciano intatti microtubuli e dineina, in presenza di ATP (anche 10 μM) si osserva un allungamento dell'assonema fino a 9 volte la lunghezza iniziale. Infatti i microtubuli esterni scorrono l'uno sull'altro come gli elementi di un canocchiale (3).

Sicuramente artefici del meccanismo di scorrimento sono quindi i bracci di dineina: sperimentalmente nell'assonema nudo la loro assenza provoca l'arresto del movimento. Questo ricompare con l'aggiunta di dineina e ATP. In assenza di ATP, i bracci di dineina non occupano tutto lo spazio presente tra una coppia e quella vicina e sono disposti a formare un angolo retto rispetto ai microtubuli. In presenza di ATP, invece, prendono contatto con la coppia adiacente e modificano il loro orientamento dirigendosi verso il basso in direzione del corpuscolo basale. Poiché la dineina è un'ATPasi, con l'idrolisi dell'ATP ogni braccio di dineina genera una forza che agisce in modo da spostare verso l'apice del ciglio la coppia di microtubuli adiacenti con cui prende contatto. Se tutti i bracci si attivassero nello stesso momento, l'assonema si avvolgerebbe a formare un'elica stretta, per cui è proprio la loro attivazione asincrona a permettere il tipico movimento a frusta del ciglio che è l'unico efficace dal punto di vista fisiologico (2, 8). In presenza di nexina e di ponti radiali, che offrono punti fermi di ancoraggio, il movimento di scorrimento si trasforma in movimento di flessione (Figura 6).

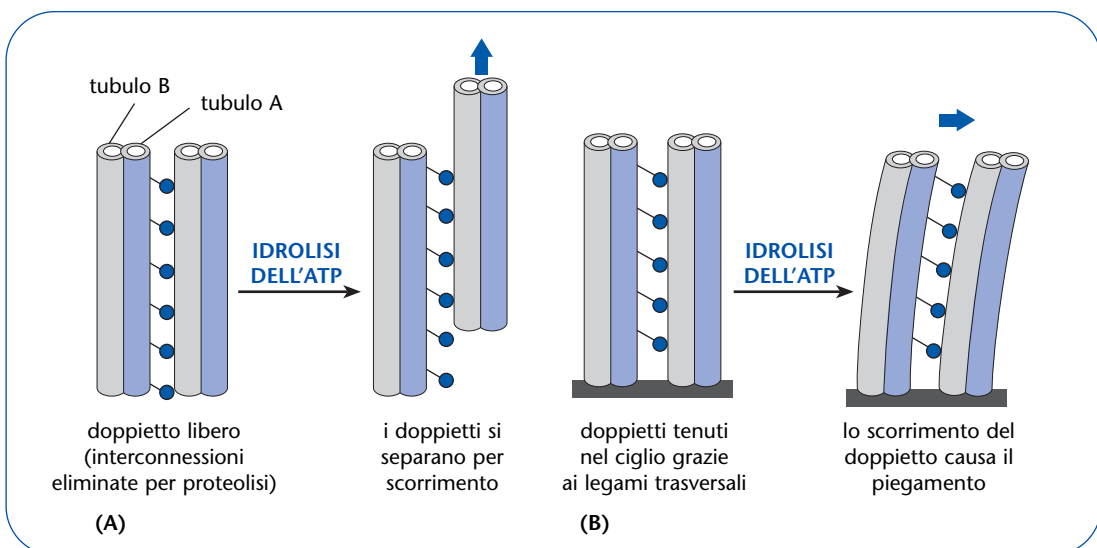


Figura 6 Lo scorrimento dei doppietti esterni di microtubuli l'uno contro l'altro (A) provoca il piegamento se i doppietti stessi sono legati insieme ad un'estremità (B). Modificato da [3].

Da studi effettuati su un'alga unicellulare provvista di 2 flagelli (*Chlamidomonas*) sembra che in condizioni di riposo l'attivazione dei bracci di dineina sia inibita da altre proteine e che il segnale trasmesso dai raggi e dalla guaina interna tolga questa inibizione promuovendo l'attivazione organizzata dei bracci di dineina lungo il flagello (3).

Il **movimento** ciliare paragonabile, come si è detto, ad un colpo di frusta, avviene sempre in un piano che è perpendicolare a quello che unisce i 2 microtubuli centrali (asse del ciglio) ed in due fasi distinte: un colpo attivo, veloce, diretto verso l'esterno, in cui l'assonema è esteso ed in grado di esercitare il massimo della spinta, seguito da un colpo di recupero, lento, in cui l'assonema si incurva e si irrigidisce dalla base verso l'apice per tornare alla posizione di partenza (Figura 7). Le ciglia

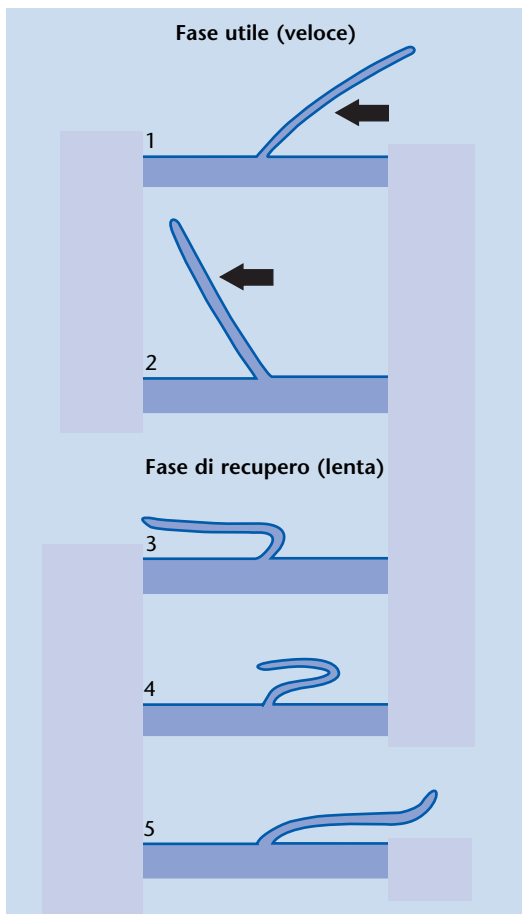


Figura 7 Schema illustrante il movimento delle ciglia. Un veloce colpo di potenza (fasi n. 1 e 2) in cui il fluido è spinto sopra la superficie della cellula, è seguito da un lento colpo di recupero (fasi 3, 4 e 5) che permette al ciglio di tornare alla posizione di partenza. Modificato da [3].

sono disposte in file parallele ed in ogni fila il battito è coordinato, sincrono, unidirezionale. Globalmente invece il battito è di tipo metacronale ed ogni fila di ciglia parallele batte in maniera asincrona, sfalsata di una frazione di secondo rispetto alle file adiacenti, con formazione di onde unidirezionali il cui effetto globale è quello di un "campo di grano battuto dal vento". Ogni ciclo dura 0,1- 0,2 secondi, pari a 10-20 flessioni al secondo (2, 3, 5).

Fisiopatologia ultrastrutturale delle ciglia

La stretta relazione tra movimento ciliare e fisiopatologia respiratoria è stata evidenziata per la prima volta in una sindrome ereditaria a trasmissione autosomica recessiva descritta nel 1933 da Kartagener e caratterizzata clinicamente dalla triade: Situs Viscerum Inversus (SVI), bronchiectasie, sinusite cronica (1-8).

Dato che una parte dei pazienti con **Sindrome di Kartagener** era affetta anche da sterilità, l'attenzione si rivolse allo studio ultrastrutturale degli spermatozoi e, vista l'analogia ultrastrutturale tra ciglia e flagelli, anche alle ciglia dell'apparato respiratorio. Nel 1975 Pedersen, Rebbe (9) ed Afzelius associarono quindi la sterilità maschile, dovuta ad immobilità degli spermatozoi, alla sintomatologia bronchitica cronica di cui soffrivano i pazienti esaminati. Poiché l'alterazione prevalente sia nelle code degli spermatozoi che nelle ciglia dell'apparato respiratorio era rappresentata dalla mancanza dei bracci esterni ed interni di dineina, Afzelius nel 1976 (10-11) ipotizzò la presenza di un disturbo generalizzato dell'attività ciliare, identificato nel 1977 (12) da Eliasson in una nuova entità definita "**Sindrome delle ciglia immobili**", anche questa congenita, responsabile di sterilità, bronchite cronica sin dalla prima infanzia, frequentemente associata a bronchiectasie e rinosinusite cronica e nel 50% dei casi a SVI (Sindrome di Kartagener).

L'esame ultrastrutturale dell'epitelio respiratorio divenne quindi essenziale per studiare le caratteristiche morfologiche delle alterazioni ciliari e distinguere le lesioni ciliari congenite primitive, da quelle acquisite, secondarie a processi flogistici, acuti o cronici, a carico delle vie aeree.

La complessità della struttura dell'assonema sicuramente è responsabile di una grande varietà di possibili lesioni, la cui eterogeneità conduce comunque ad un unico difetto funzionale e cioè

all'incapacità del ciglio di rimuovere il muco ed al suo conseguente ristagno, alla perdita del ruolo fisiologico protettivo e alla successiva comparsa di quadri patologici a carico delle alte e basse vie respiratorie peraltro relativamente omogenei nel loro decorso (5, 13-15).

D'altra parte è da sottolineare che analisi funzionali al microscopio a contrasto di fase hanno dimostrato che le ciglia non sono necessariamente immobili, ma possono presentare gradi qualitativamente e quantitativamente diversi di alterata motilità rimanendo invariato l'effetto complessivo negativo sulle capacità di clearance ciliare della mucosa respiratoria. Per tale motivo si è affiancato al termine di "Sindrome delle ciglia immobili", quello di **Discinesia Ciliare Primitiva (DCP)** includendo in tale espressione tutte le forme di anomalie congenite delle ciglia che si traducono in alterato trasporto mucociliare, di cui la SCI e la Sindrome di Kartagener sarebbero solo dei sottogruppi (3, 16-19).

Le anomalie ultrastrutturali caratteristiche di patologia ciliare congenita, riviste da Afzelius nel 1987 (20) ed universalmente confermate dagli altri Autori (5, 6, 13, 16, 17, 21), sono rappresentate da:

- assenza dei bracci interno ed esterno di dineina (Figura 8);
- riduzione del numero dei bracci di dineina sia interno che esterno, spesso del 50% circa;
- accorciamento dei bracci esterni e possibile assenza di quelli interni (Figura 9);
- assenza dei soli bracci esterni;
- assenza dei soli bracci interni;
- assenza dei ponti radiali o solamente delle loro

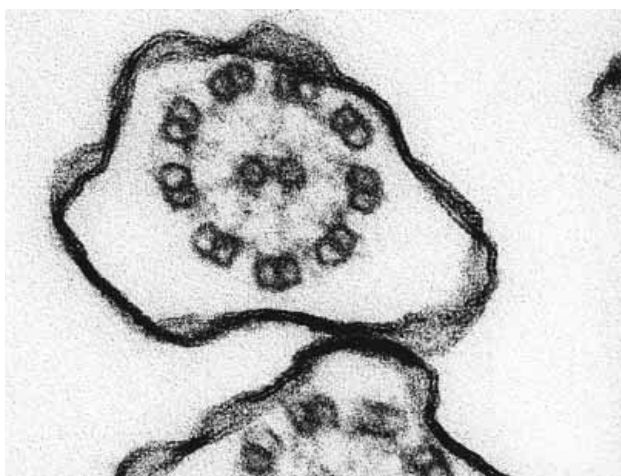


Figura 8 Micrografia elettronica a trasmissione (TEM) di sezione trasversale di un ciglio di mucosa nasale umana. Si noti la totale assenza dei bracci interno ed esterno di dineina. ME 298200X

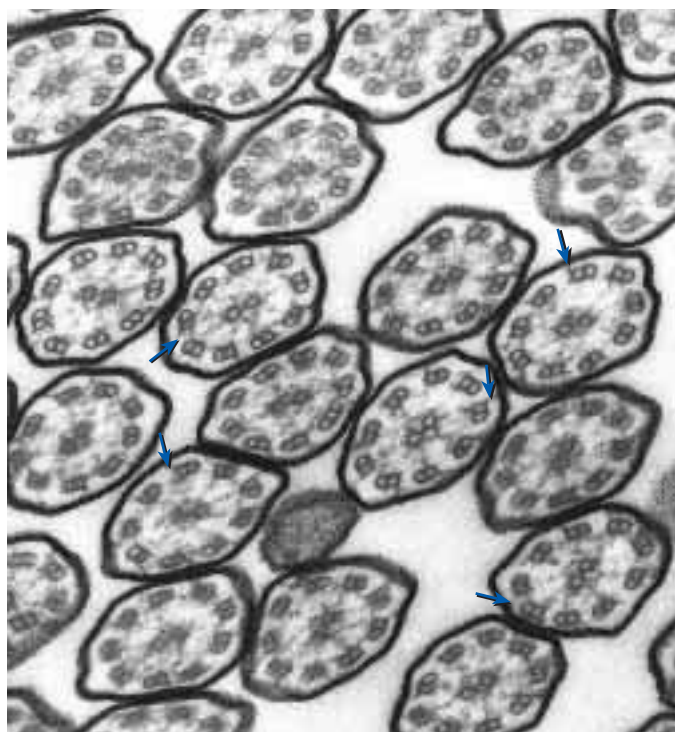


Figura 9 Micrografia elettronica a trasmissione (TEM) di sezioni trasversali di ciglia di mucosa bronchiale umana. Il braccio esterno di dineina, quando presente, è accorciato (→) ed il braccio interno è assente. ME 177500X

teste e/o assenza della guaina centrale con conseguente decentramento dei microtubuli centrali (difetto dei ponti radiali) (22);

- assenza od accorciamento dei microtubuli centrali e spostamento della coppia n. 1 di microtubuli periferici al centro (trasposizione) (23);
- assenza dei legami di nexina, dei ponti radiali, dei bracci interni di dineina, con conseguente perdita della disposizione circolare delle coppie di microtubuli e "disorganizzazione" dell'assonema;
- assenza dei microtubuli centrali e dei bracci interni di dineina (1, 6);
- presenza di una normale ultrastruttura delle ciglia in sezione trasversale, che comunque si associa a una immobilità o ipermotilità delle stesse con conseguente perdita della loro funzione di difesa. In alcuni casi le ciglia hanno una lunghezza approssimativamente 2 volte il normale;
- assenza delle ciglia e dei relativi corpuscoli basali. In questo caso le cellule ciliate possono essere sostituite da cellule provviste di lunghi microvilli;
- alterazione del normale orientamento delle ciglia. Infatti la direzione della flessione sembra determinata dall'orientamento della coppia centrale di

microtubuli e lo sforzo attivo avviene nel piano che passa tra i due (2-3).

Recentemente alcuni Autori hanno segnalato la possibile esistenza di un nuovo tipo di lesione congenita da loro definita "cystlike", da verificare in futuro con ulteriori studi (24).

Lo studio ultrastrutturale di un numero sempre più vasto di casi ha permesso di evidenziare accanto a quelle congenite (7, 25-28), tutta una serie di *alterazioni secondarie, aspecifiche*, strettamente correlate allo stato di flogosi, presenti fino ad un 10% anche nelle ciglia di soggetti normali (3, 6, 28) ed in percentuale maggiore nei vari tipi di patologia acquisita, sia acuta che cronica, dell'apparato respiratorio (**discinesie ciliari secondarie**) (8, 17, 26-33).

Il *pattern* di queste lesioni è sostanzialmente diverso da quello rilevato nelle forme congenite ed è rappresentato da:

- swollen cilia, ciglia con aumento della matrice citoplasmatica (Figura 10);

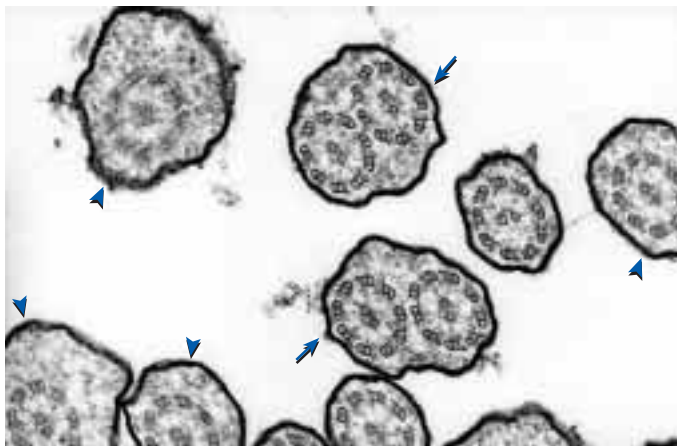


Figura 10 Micrografia elettronica a trasmissione (TEM) di sezioni trasversali di ciglia di mucosa nasale umana. Si noti la presenza di assonemi multipli (→) e di swollen cilia (▶) accanto a ciglia ad ultrastruttura normale. ME 119600X

- assonemi multipli, cioè ciglia che contengono più di un assonema completo o incompleto all'interno di una singola membrana citoplasmatica (Figura 10);
- ciglia intracitoplasmatiche, cioè ciglia che si proiettano in larghe cavità intracellulari;
- alterazioni a carico delle coppie periferiche (una o più coppie periferiche assenti od aggiuntive, uno o più microtubuli periferici assenti od aggiuntivi);
- dislocazione di una o più coppie periferiche (Figura 11);

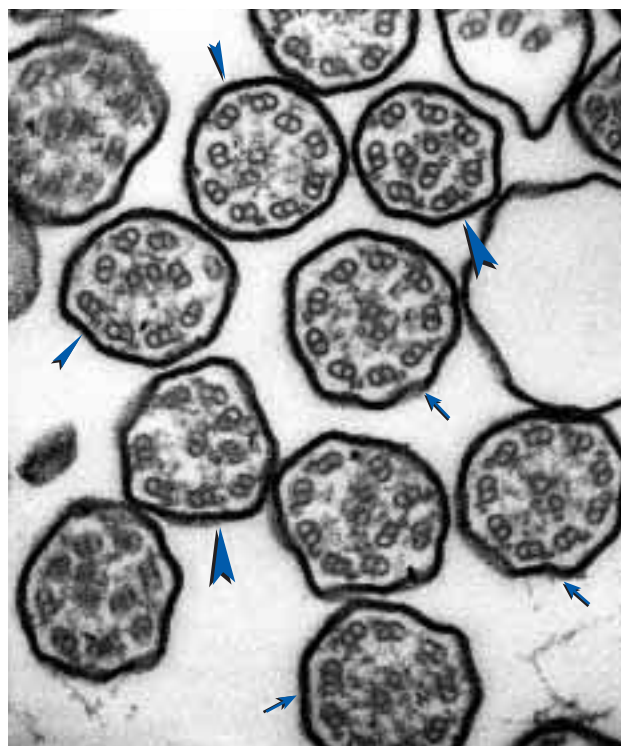


Figura 11 Micrografia elettronica a trasmissione (TEM) di sezioni trasversali di ciglia di mucosa bronchiale umana. Oltre ad assonemi normali (→), si osservano assonemi con dislocazione della coppia centrale e conseguente irregolare disposizione delle coppie periferiche (▶) oppure assenza di uno o di entrambi i microtubuli centrali e traslocazione al centro di una o più coppie periferiche (►). ME 165600X

- microtubuli incompleti;
- alterazioni delle coppie o dei microtubuli centrali (coppia o microtubulo centrale assenti o aggiuntivi) (Figura 11).

Tali alterazioni possono presentarsi singolarmente o variamente associate nello stesso assonema.

Morfometria ultrastrutturale delle ciglia: la nostra esperienza

La nostra esperienza riguarda l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione di campioni di mucosa respiratoria prelevati nella maggior parte dei casi a livello della mucosa nasale (34) a soggetti, prevalentemente in età pediatrica, affetti da infezioni respiratorie ricorrenti e da vari tipi di patologia con interessamento delle alte e basse vie respiratorie, al fine di verificare la presenza e l'importanza di eventuali lesioni ciliari e soprattutto la natura congenita o acquisita di queste ultime. La tecnica più usata per il campionamento è stata

quella del *brushing* nasale (35) procedura semplice, poco invasiva e che non richiede anestesia. Tuttavia è necessario sottolineare che l'esecuzione di un *brushing*, per quanto apparentemente semplice, richiede tutta una serie di accorgimenti in quanto, di fatto, rappresenta il momento più importante per ottenere un campione adeguato per lo studio ultrastrutturale delle ciglia. Innanzitutto è preferibile prelevare la mucosa lontano da infezioni respiratorie acute o da riacutizzazioni di una patologia cronica e a soggetti che non abbiano assunto farmaci almeno nelle 48 ore precedenti lo studio. Una volta effettuato il *brushing*, il materiale biologico deve essere così trattato: la spazzola deve essere lavata in 2-3 cc. di soluzione fisiologica agitandola molto delicatamente; si centrifuga per 5-8 minuti a non più di 2000 giri/min; si toglie lentamente il surnatante; si inclina leggermente la provetta contenente il materiale sedimentato e si aggiunge lentamente il fissativo (glutaraldeide al 2% e paraformaldeide al 2% in tampone fosfato 0,15M) facendolo scorrere lungo la parete, avendo cura di non rimandare in sospensione le cellule. La provetta va poi tenuta ferma in frigorifero a 4°C per 1-2 ore. Dopo una fissazione di almeno 3 ore a 4°C, il materiale biologico viene post-fissato in osmio tetrossido all'1% più ferrocianuro all'1%, disidratato in alcool a gradazione crescente ed incluso in una miscela di epon-araldite.

Per ogni prelievo vengono eseguite diverse sezioni semifini del materiale biologico, colorate con blu di toluidina e osservate al microscopio ottico. Le sezioni semifini sono di orientamento e servono all'operatore per poter scegliere il campo migliore per l'osservazione al microscopio elettronico. Nel nostro caso il campo migliore è quello in cui le ciglia sembrano essere orientate il più possibile in modo trasversale; infatti le sezioni utili per lo studio ultrastrutturale sono quelle trasversali che interessano il ciglio nella sua porzione intermedia, viste le modificazioni strutturali dell'assonema presenti in quella prossimale e distale (Figura 5) (7).

Le sezioni fini vengono tagliate con Ultratome III LKB e quindi colorate con piombo citrato per l'indagine ultrastrutturale. Tutte le sezioni così ottenute sono studiate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM: Philips CM10, Philips EM208).

Le ciglia sono osservate e quindi fotografate, ad ingrandimenti iniziali variabili da 45000 a 91000. I dati qualitativi e quantitativi relativi a ciascun caso

sono raccolti in un'apposita tabella delle lesioni ciliari (Tabella 1).

Per effettuare un esatto inquadramento nosologico del caso in esame riteniamo sia indispensabile studiare almeno 70 assonemi adeguatamente sezionati, anche se abitualmente ne vengono esaminati molti di più (in media 125 assonemi in 15 cellule ciliate).

Nel corso della nostra attività (Tabella 2), oltre a riscontrare casi con *pattern* ultrastrutturale patognomonico di lesioni congenite o compatibili con la presenza di flogosi cronica, oppure da considerare nei limiti della norma, abbiamo evidenziato un gruppo di soggetti a *pattern* intermedio, con lesioni ultrastrutturali tipiche della DCP, ma in bassa quantità, da noi in passato definiti *borderline*. Più propriamente tali pazienti presentavano una percentuale di elementi patologici superiore a quella riscontrata nelle forme acquisite di flogosi cronica ed un *pattern* ultrastrutturale particolare per la presenza di alterazioni "specifiche" dei bracci di dineina e/o della coppia centrale con distribuzione focale, associate ad un variabile numero di lesioni secondarie, aspecifiche. Tale gruppo, eterogeneo dal punto di vista clinico, verosimilmente comprende sia soggetti con una maggiore predisposizione ad ammalarsi e una minore tendenza alla risoluzione del quadro clinico che soggetti a deficit congenito parziale (2). La patologia della coppia centrale e della dineina, infatti, secondo alcuni Autori, sarebbe compatibile anche con una condizione di particolare gravità della flogosi (33).

La microscopia elettronica delle ciglia assume quindi un ruolo essenziale nell'iter diagnostico delle affezioni respiratorie croniche presenti in modo particolare in età pediatrica, in quanto permette di distinguere da un punto di vista qualitativo le forme congenite da quelle acquisite e anche di valutarle da un punto di vista quantitativo. Infatti difetti comunemente considerati di natura congenita quali la traslocazione, la trasposizione, l'aplasia ciliare e l'alterato orientamento possono essere anche conseguenza di una flogosi cronica (36) (o per azione diretta o per alterata rigenerazione), per cui più che il dato morfologico qualitativo, in questi casi è il dato quantitativo ad indirizzare la diagnosi verso l'una o l'altra forma.

D'altra parte se è vero che la microscopia elettronica è in grado di diagnosticare facilmente una forma congenita da un'acquisita quando sono

Tabella 1 Tabella delle lesioni ciliari.

TABELLA DELLE LESIONI CILIARI		N.
Paziente.....		Data
Sede del prelievo.....		
-ASSONEMI SPIRALIZZATI		
-ASSONEMI DISORGANIZZATI		
-ASSONEMI MULTIPLI		
-SWOLLEN CILIA		
-MICROTUBULI PERIFERICI	assenti	uno
		più di uno
	aggiuntivi	uno
		più di uno
-COPPIE PERIFERICHE	assenti	una
		più di una
	aggiuntive	una
		più di una
-COPPIA CENTRALE	assente	una
		più di una
	aggiuntiva	una
		più di una
-MICROTUBULO CENTRALE	assente	
	aggiuntivo	uno
		più di uno
-ASSENZA BRACCI DI DINEINA		int.+est.
		est.
		int.
-ACCORCIAMENTO BRACCI DI DINEINA		int.+est.
		est.
		int.
-DISLOCAZIONE COPPIA CENTRALE		
-DISLOCAZIONE COPPIA PERIFERICA		
-ALTRO		
		N.TOT.
-ASSONEMI A NORMALE ULTRASTRUTTURA		N.TOT. <input type="text"/>
N. CELLULE ESAMINATE:		
TOTALE CIGLIA ESAMINATE:		
% CIGLIA PATOLOGICHE:		
NOTE:		

soddisfatti quei criteri di specificità, permanenza ed universalità delle lesioni (36) indispensabili per una diagnosi certa, ci sono delle situazioni in cui anche con l'esame ultrastrutturale la diagnosi differenziale può risultare problematica (37-38). Sono stati infatti descritti dei casi di forme congenite con ultrastruttura normale (36, 39-42) e ciò non dovrebbe sorprendere se si pensa alle 200 proteine che formano l'assonema e che la lesione potrebbe essere ad un livello biochimico

non evidenziabile con la sola morfologia (2, 5). La nostra più recente esperienza (43) dimostra che è soprattutto in questi casi ed in quei soggetti a *pattern* ultrastrutturale intermedio precedentemente descritti che acquista una maggiore importanza l'aspetto multidisciplinare dell'approccio a questo tipo di malattie per la cui diagnosi dovrebbero essere valutati, oltre al dato morfologico, anche quello clinico e funzionale al microscopio a contrasto di fase (44-47).

Tabella 2 Casistica dell'U.O. di Microscopia Elettronica - Dipartimento di Patologia - Azienda Ospedaliera "Umberto I" - Ancona.
 ° La loro distribuzione non comprende le variazioni diagnostiche effettuabili sulla base dello studio funzionale [43].
 * Media±DS.

	DCP	Normali	Flogosi	Pattern Intermedio
Casi con numero di assonemi studiati >70 N°	30	12	103	36
Cellule ciliate esaminate N.*	12,9±7,5	15,7±7,4	15,4±5,1	15,9±7,3
Totale ciglia esaminate N.*	111,7±49,2	123,5±42,4	139,0±55,0	135,7±74,4
% Ciglia patologiche*	96,2±9,0	6,8±1,9	42,8±18,1	54,7±22,0

Bibliografia

1. Afzelius BA, Eliasson R. *Flagellar mutants in man. On the heterogeneity of the immotile - cilia syndrome.* J Ultrastr Res 1979; 69:43-52.
2. Afzelius BA. *Disorders of ciliary motility.* Hosp Pract 1986; 21: 73-80.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. *Biologia molecolare della cellula.* II ed. Zanichelli. 1991: 767-777.
4. Palmblad J, Mossberg B, Afzelius BA. *Ultrastructural, cellular, and clinical features of the immotile cilia syndrome.* Ann Rev Med 1984; 35: 481-492.
5. Meeks M, Bush A. *Primary ciliary dyskinesia (PCD).* Pediatr Pulmonol 2000; 29 (4): 307-316.
6. Rossman CM, Newhouse MT. *Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management.* Pediatr Pulmonol 1988; 5: 36-50.
7. Schidlow DV. *Primary ciliary dyskinesia (the immotile cilia syndrome).* Ann Allergy 1994; 73: 457-469.
8. Afzelius BA, Camner P, Mossberg B. *Acquired ciliary defects compared to those seen in the immotile cilia syndrome.* Am Rev Med 1983; 35: 481-492.
9. Pedersen H, Rebbe H. *Absence of arms in the axoneme of immobile human spermatozoa.* Biol Reprod 1975; 12: 541-544.
10. Pedersen M, Mygind N. *Absence of axonemal arms in nasal mucosa cilia in Kartagener's syndrome.* Nature 1976; 262: 494-495.
11. Afzelius BA. *A human syndrome caused by immotile cilia.* Science 1976; 193: 317-319.
12. Eliasson R, Mossberg B, Camner P, Afzelius BA. *The immotile cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male infertility.* N Engl J Med 1977; 297: 1-6.
13. Chao J, Turner JAP, Sturgess JM. *Genetic heterogeneity of dynein-deficiency in cilia from patients with respiratory disease.* Am Rev Respir Dis 1982; 125: 302-305.
14. Afzelius BA. *The immotile cilia syndrome: ultrastructurally heterogeneous and clinically homogeneous.* Eur J Resp Dis 1985; 66: 161-163.
15. Pennarun G, Chapelin C, Escudier E, et al. *The human dynein intermediate chain 2 gene (DNAI2): cloning, mapping, expression pattern, and evaluation as a candidate for primary ciliary dyskinesia.* Hum Genet 2000; 107: 642-649.
16. Rossman CM, Forrest JB, Lee RMKW, Newhouse MT. *The dyskinetic cilia syndrome. Ciliary motility in immotile cilia syndrome.* Chest 1980; 78: 580-582.
17. Rossman CM, Lee RMKW, Forrest JB, Newhouse MT. *Nasal ciliary ultrastructure and function in patient with primary ciliary dyskinesia compared with that in normal subjects and in subjects with various respiratory diseases.* Am Rev Respir Dis 1984; 129: 161-167.
18. Greenstone M, Cole JP. *Primary ciliary dyskinesia.* Arch Dis Child 1984; 59: 704-706.
19. Cowan MJ, Gladwin MT, Shelhamer JH. *Disorders of ciliary motility.* Am J Med Sci 2001; 321 (1): 3-10.
20. Afzelius BA, Mossberg B. *Immotile-Cilia Syndrome (Primary Ciliary Dyskinesia), including Kartagener's syndrome.* In "The metabolic basis of inherited disease" (cap. 112), Ed. Vallee et al. 1987.
21. Bautista-Harris G, Julià-Serdà G, Rodriguez de Castro F, et al. *Absence of Central Microtubules and Transposition in the Ciliary Apparatus of Three Siblings.* Respiration 2000; 67: 449-452.
22. Sturgess MJ, Chao J, Wong J, et al. *Cilia with defective radial spokes. A cause of human respiratory disease.* N Engl J Med 1979; 300: 53-56.
23. Sturgess MJ, Chao J, Turner JAP. *Transposition of ciliary microtubules. Another cause of impaired ciliary motility.* N Engl J Med 1980; 303: 318-322.
24. Tsang KWT, Tipoe G, Sun J, et al. *Severe Bronchiectasis in Patients with "Cystlike" Structures within the Ciliary Shafts.* Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1300-1305.
25. Carlén B, Stenram U. *Ultrastructural diagnosis in the immotile cilia syndrome.* Ultrastruct Pathol 1987; 11: 653-658.
26. Carson JL, Collier AM, Fernald GW, Hu SS. *Microtubular discontinuities as acquired ciliary defects in airway epithelium of patients with chronic respiratory diseases.* Ultrastruct Pathol 1994; 18: 327-332.
27. Lurie M, Rennert G, Goldenberg S, et al. *Ciliary ultrastructure in primary ciliary dyskinesia and other chronic respiratory conditions: the relevan-*

- ce of microtubular abnormalities. *Ultrastruct Pathol* 1992; 16: 547-553.
- 28.** Wisseman C, Simel D, Spock A, Shelburne J. *The prevalence of abnormal cilia in normal pediatric lungs.* *Arch Pathol Lab Med* 1981; 105: 552-555.
- 29.** Smallman LA, Gregory J. *Ultrastructural abnormalities of cilia in the human respiratory tract.* *Hum Pathol* 1986; 17: 848-855.
- 30.** Escudier E, Boucherat M, Pinchon MC, et al. *Des anomalies ciliaires sont-elles toujours présentes dans le syndrome de Kartagener? Une étude chez 16 patients.* *Ann Otolaryngol (Paris)* 1989; 106: 302-305.
- 31.** Buchdahl RM, Reiser J, Ingram D, et al. *Ciliary abnormalities in respiratory disease.* *Arch Dis Child* 1988; 63: 238-243.
- 32.** Afzelius BA. *"Immotile cilia" syndrome and ciliary abnormalities induced by infection and injury.* *Am Rev Respir Dis* 1981; 124: 107-109.
- 33.** Carson JL, Collier AM, Hu SS. *Acquired ciliary defects in nasal epithelium of children with acute viral upper respiratory infections.* *New Engl J Med* 1985; 312 (8): 463-468.
- 34.** Verra F, Fleury-Feith J, Boucherat M, et al. *Do nasal ciliary changes reflect bronchial changes? An ultrastructural study.* *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 908-913.
- 35.** Rutland J, Cole PJ. *Non-invasive sampling of nasal cilia for measurement of beat frequency and study of ultrastructure.* *Lancet* 1980; ii: 564-565.
- 36.** Mierau GW, Agostini R, Beals TF, et al. *The role of electron microscopy in evaluating ciliary dysfunction: report of a workshop.* *Ultrastruct Pathol* 1992; 16: 245-254.
- 37.** Jorissen M, Willems T. *Success rates of respiratory epithelial cell culture techniques with ciliogenesis for diagnosing primary ciliary dyskinesia.* *Acta Otorhinolaryngol Belg* 2000; 54: 357-365.
- 38.** Jorissen M, Willems T, van der Schueren B, et al. *Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture.* *Acta Otorhinolaryngol Belg* 2000; 54: 343-356.
- 39.** Greenstone MA, Dewar A, Cole PJ. *Ciliary dyskinesia with normal ultrastructure.* *Thorax* 1983; 38: 875-876.
- 40.** Greenstone M, Rutman A, Pavia D, et al. *Normal axonemal structure and function in Kartagener's syndrome: an explicable paradox.* *Thorax* 1985; 40: 956-957.
- 41.** Herzon FS, Murphy S. *Normal ciliary ultrastructure in children with Kartagener's syndrome.* *Ann Otol* 1980; 89: 81-83.
- 42.** Escudier E, Escalier D, Homasson JP, et al. *Unexpectedly normal cilia and spermatozoa in an infertile man with Kartagener's syndrome.* *Eur J Respir Dis* 1987; 70: 180-186.
- 43.** Pifferi M, Cangiotti AM, Ragazzo V, et al. *Primary ciliary dyskinesia: Diagnosis in children with inconclusive ultrastructural evaluation.* *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12: 274-282.
- 44.** Pedersen M. *Specific types of abnormal ciliary motility in Kartagener's syndrome and analogous respiratory disorders. A quantified microphoto-oscillographic investigation of 27 patients.* *Eur J Respir Dis* 1983; 64 (Suppl. 127): 78-90.
- 45.** Bush A, Cole P. *Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care.* *Eur Respir J* 1998; 12: 982-988.
- 46.** Chapelin C, Coste A, Reinert P, et al. *Incidence of primary ciliary dyskinesia in children with recurrent respiratory diseases.* *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 854-858.
- 47.** Afzelius BA. *Immotile cilia Syndrome: past, present, and prospects for the future.* *Thorax* 1998; 53: 894-897.

Simonetta Baldi

Servizio di Fisiopatologia Respiratoria - Fondazione "Salvatore Maugeri" I.R.C.C.S. - Istituto Scientifico di Riabilitazione di Montescano - 27040 Montescano - Pavia

Studio del trasporto mucociliare del polmone: i metodi clinici di analisi

Lung mucociliary transport: clinical methods of analysis

Parole chiave: trasporto mucociliare, scintigrafia polmonare da ventilazione, bronchiectasie

Key words: mucociliary clearance, ventilation lung scintigraphy, bronchiectasis

Riassunto. La patologia ciliare in età pediatrica può essere studiata mediante tecniche che misurano: a) velocità del muco tracheale o b) trasporto mucociliare del polmone. Le prime richiedono brevi periodi di osservazione, forniscono misure ripetibili, relative ad una sede anatomica definita e presentano minimi artefatti dovuti alla tosse. Tuttavia, sono invasive e non proponibili nei bambini. Tra le seconde, la tecnica dei radioaerosol è la più utile e fornisce informazioni sulla funzione mucociliare dell'intero sistema bronchiale. Il metodo di analisi che noi proponiamo quantizza il tempo di trasporto mucociliare mediante un indice, il $T_{1/2}$, che è affidabile e riproducibile. L'uso di una metodica di indagine clinica è necessario per la selezione dei pazienti con infezioni ricorrenti da sottoporre ad analisi morfologica ed ultrastrutturale dell'apparato ciliare. Per confrontare i risultati ottenuti nei diversi centri, è necessaria una standardizzazione della metodica. La correlazione tra dati funzionali ed alterazioni della morfologia e della ultrastruttura delle ciglia è tutt'oggi un campo poco esplorato ed un importante obiettivo della ricerca futura.

Summary. Diseases related to ciliary dysfunction can be assessed by means of techniques that measure a) tracheal mucous velocity, or b) mucociliary transport rate of the lung. The first ones require short period of observation, are reliable measurements from a specific anatomic site and are not affected by artifacts due to cough. However, they are invasive and not suitable for children. Among the second ones, radioaerosol technique is the best in children. It enables the evaluation of the mucociliary function of the bronchial system. With the method we propose, mucociliary transport rate is measured as $T_{1/2}$, an index that is reliable and reproducible. A clinical method of analysis is necessary to screen patients with recurrent infections of the respiratory tract who must undergo ultrastructural and morphologic analysis of cilia. Standardization of the technique is necessary to compare results from different laboratories. Nowadays, the relationship between ciliary function with morphology and ultrastructure of cilia is not completely understood and represents a goal of future research.

Corrispondenza: Dott.ssa S. Baldi, Servizio di Fisiopatologia Respiratoria, Fondazione "Salvatore Maugeri" I.R.C.C.S. Istituto Scientifico di Riabilitazione di Montescano - 27040 Montescano - Pavia; e-mail: sbaldi@fsm.it

Introduzione

La rimozione dalle vie aeree di inquinanti ambientali, agenti batterici e virali inalati, per mezzo dei meccanismi di trasporto mucociliare, rappresenta un importante sistema di difesa del polmone (1). L'insufficienza dei meccanismi di trasporto mucociliare contribuisce all'ostruzione delle vie aeree ed aumenta la suscettibilità alle infezioni respiratorie (1).

○ Meccanismi di trasporto mucociliare

- ✓ Clearance tracheobronchiale
- ✓ Tosse
- ✓ Clearance alveolare

La clearance tracheobronchiale è il risultato dell'interazione tra le cellule ciliate presenti dalla trachea (generazione 0) fino ai bronchioli terminali (generazione 16) ed il muco prodotto dagli elementi ghiandolari presenti dalle vie aeree cartilaginee fino ai bronchioli respiratori.

Ci sono 5 cellule ciliate per ogni elemento ghiandolare muco-secerente. Ciascuna di esse possiede 200 ciglia, con un diametro di circa 0.3 μm . La lunghezza delle ciglia decresce da 6 μm in trachea a 3.6 μm a livello della 7° generazione bronchiale e si riduce ulteriormente spostandoci verso la periferia del polmone.

Le ciglia si muovono per 1/4 del loro ciclo spostando il muco verso la bocca e per 3/4 si piegano

in direzione opposta (fase attiva di ritorno o "recovery phase"). Esse battono ad una frequenza di 700-1000 battiti/min⁻¹. Il battito ciliare normale non è simultaneo, ma è coordinato in modo da generare onde metacronali, che viaggiano in direzione opposta all'effettivo battito ciliare ed al flusso del muco. In tal modo le secrezioni vengono spostate contro gravità. Le ciglia riescono a spostare pesi di 10 gr/cm² senza compromettere la loro attività. Il volume totale del muco rimosso in un giorno varia da 10 a 100 ml (i valori sono stati ricavati da osservazioni su soggetti tracheostomizzati e su animali da esperimento). È noto tuttavia che pazienti con bronchite cronica nei periodi di remissione possono produrre 30-100 ml/die e fino a 200 ml nei periodi di riacutizzazione (2).

La tosse agisce come una pompa che impiega l'energia prodotta dal flusso aereo per rimuovere il muco. La velocità lineare dell'aria nel lume bronchiale è di 25 m/s². La efficacia della tosse è massima in trachea dove le velocità sono dell'ordine di 160-240 m/s² (1/2 - 3/4 della velocità del suono). La tosse è un meccanismo compensatorio quando la clearance tracheobronchiale è alterata (3).

La clearance alveolare rappresenta la fase lenta delle particelle insolubili depositate sulle regioni respiratorie del polmone ed è garantita soprattutto dai macrofagi alveolari (4).

Il trasporto mucociliare è dunque una funzione estremamente complessa determinata dall'interazione tra il battito delle ciglia ed il muco, di cui assicura la propulsione.

Lo studio del trasporto mucociliare *in vivo*, mediante radioaerosol è la tecnica che meglio si presta ad acquisire informazioni su questa funzione di difesa, che risulta compromessa in varie patologie congenite ed acquisite del bambino.

Alcuni autori hanno dimostrato in soggetti normali che il trasporto mucociliare è temporalmente continuo e può essere espresso come una funzione tempo-dipendente (5, 6). Questa funzione varia in accordo alle caratteristiche aerodinamiche delle particelle inalate, al *pattern* iniziale di deposizione ed alle tecniche di acquisizione (7, 8). La mancanza di una standardizzazione delle varie metodiche rende tuttavia difficile il confronto e l'interpretazione dei risultati pubblicati in letteratura.

I metodi clinici di analisi: la velocità del muco tracheale e lo studio del trasporto mucociliare

La misurazione della velocità del muco tracheale si basa sulla deposizione di particelle di materiale inerte radiopaco nelle vie aeree superiori (trachea), di dimensioni tali da poter essere seguito durante il trasporto mucociliare per mezzo di strumenti di rilevazione, collocati esternamente.

L'insufflazione di polvere di tantalio (9) o l'inserimento broncoscopico di particelle di teflon rese radiopache (10) soddisfano le suddette caratteristiche.

La nebulizzazione di particelle marcate con radioisotopi di dimensioni intorno ai 10 μ è stata pure impiegata a tale scopo (11).

La tecnica radio-broncoscopica è una metodica invasiva, che prevede il posizionamento del fibrobroncoscopio sopra la glottide e la successiva insufflazione di dischi di teflon mischiati per il 50% del volume a polvere di triossido di bismuto. Il movimento dei dischi viene visualizzato attraverso un monitor e registrato mediante un videoregistratore. Le dimensioni dell'immagine vengono calibrate per mezzo di una griglia sovrapposta all'immagine durante il tempo di registrazione del filmato della durata di 2-4 minuti. Una media di circa 15 dischi risulta visibile in ogni filmato. La distanza percorsa da ogni disco viene misurata in millimetri, il tempo viene misurato con un orologio digitale. La velocità rilevata per ogni disco viene espressa in mm/min. La velocità del trasporto mucociliare è la media delle velocità dei singoli dischi, che si muovono in senso cefalico (10).

Lo stesso tipo di informazione può essere ottenuto, previa nebulizzazione di particelle di albumina umana di circa 9 μm di diametro o con sol di ossido di ferro entrambi marcati con ^{99m} tecnezio e con successiva rilevazione delle curve di attività-tempo mediante gammacamera (11).

In *tabella 1* sono schematizzati i risultati ottenuti con l'uso delle differenti metodiche su soggetti normali. Dai risultati di tali studi emerge un'ampia variabilità della velocità misurata con le diverse tecniche in condizioni patologiche, ma anche un'ampia variabilità interindividuale nella velocità del trasporto del muco tracheale in soggetti sani. Le ragioni di questa variabilità non sono chiare. Sebbene l'invasività delle procedure possa in parte influenzare i risultati, è probabile che esista una considerevole variabilità nella clearance mucociliare

Tabella 1 Velocità del muco tracheale (media±DS) nei soggetti sani.

Tecnica	No. sogg.	VMT	Autore
Boli di radioaerosol	42	4.7	Yeates et al.
	7	4.4±1.3	Wong et al.
	8	6.3±0.8	Foster et al.
	4	4.9	Foster et al.
	11	4.6±2.4	Spector et al.
Cine-broncoscopia	16	21.5±5.5	SantaCruz et al.
	20	20.1±6.3	Wood et al.
	6	15.5±0.7	Chopra et al.
Radiografica	7	11.4±3.8	Friedman et al.
	10	10.1±3.5	Goodman et al.
	7	5.8±2.6	Goodman et al.

di soggetti normali. Infatti, anche i risultati ottenuti con tecniche non invasive come quella dei radioaerosol presentano una discreta variabilità interindividuale.

Nella *tabella 2* sono riassunti i principali tipi di particelle e radioisotopi per lo studio dei meccanismi di trasporto mucociliare. I dischi di teflon vengono impiegati per la misura della velocità del muco tracheale. Le particelle di piccole dimensioni, invece, vengono utilizzate per la misurazione del trasporto

Tabella 2 Tipi di aerosol e tipi di radionuclidi con relativa emivita impiegati nello studio del trasporto mucociliare.

Tipo di aerosol	Autore
Microsfere di albumina	Yeates et al. 1974
Minimicrosfere di albumina	Santolicandro et al. 1986
Ossido di Ferro	Morrow et al. 1967
Polistirene	Few et al. 1970
Resina	Bertrand and Puchelle 1977
Teflon	Camner and Philipson 1971

Radionuclide	Emivita	Autore
99Tc	6 h	Lancet 1968
18F	110 min.	Camner et al. 1972
82Br	36 h	Black and Walsh 1970
54Mn	312 d	Morrow et al. 1967
131I	8.04 d	Black and Walsh 1970
198Au	2.7 d	Lourenco et al. 1971

tracheobronchiale *in vivo*. Se marcate con isotopi a lunga emivita si prestano a seguire l'efficienza del trasporto per giorni.

Lo studio del trasporto mucociliare *in vivo* si basa essenzialmente sulla tecnica dei radioaerosol. Per comprendere le potenzialità ed i limiti della tecnica è importante conoscere i meccanismi di deposizione degli aerosol nell'albero tracheobronchiale.

I meccanismi di deposizione degli aerosol nel l'albero tracheobronchiale:

- a) impatto inerziale,
- b) sedimentazione gravitazionale,
- c) diffusione molecolare

Essi dipendono da:

- 1) proprietà fisiche dell'aerosol:
dimensioni delle particelle,
densità, $d_a = d \times r^{1/2}$
igroscopicità
carica elettrica;
- 2) geometria dell'albero bronchiale;
- 3) modo di inalazione dell'aerosol

La deposizione di un aerosol nell'albero tracheobronchiale dipende soprattutto dalle dimensioni delle particelle inalate e dalla geometria delle vie aeree ai vari livelli. Quando particelle di calibro da 0.5 ad 1.0 μm di diametro marcate con isotopi gamma emittenti vengono inalate, esse si depositano nell'albero tracheobronchiale per effetto del trasporto di massa della ventilazione convettiva, con meccanismi di impatto inerziale e di sedimentazione gravitazionale. Esse pertanto definiscono dei volumi di distribuzione diversi dai volumi gassosi. L'ostruzione bronchiale aumenta marcatamente la quota di particelle che si depositano con un meccanismo di impatto inerziale. La *figura 1*, ridisegnata da Santolicandro e coll. (12), illustra gli effetti della riduzione del calibro delle vie aeree sulla deposizione di un aerosol monodisperso di minimicrosfere di albumina di dimensioni $<1.0 \mu\text{m}$, erogate mediante nebulizzatore di tipo Venturi. Si noti come, dimezzando il calibro bronchiale, la quota di particelle deposta per impatto aumenta di circa 4 volte.

La gammacamera planare consente di rilevare immagini che riflettono la ridistribuzione della ventilazione convettiva a livello regionale in presenza di patologia ostruttiva delle vie aeree. La

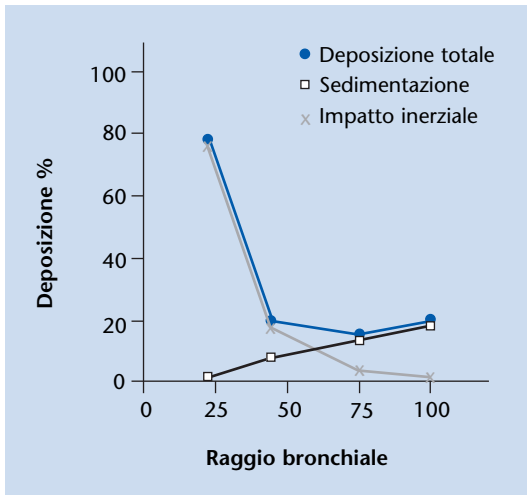


Figura 1 La percentuale delle particelle deposte è plottata verso il raggio del lume bronchiale espresso in percentuale del totale. I simboli si riferiscono al meccanismo di deposizione: il cerchio indica la deposizione totale; il quadrato aperto, la sedimentazione gravitazionale; l'asterisco, l'impatto inerziale. Quando il calibro bronchiale è ridotto ad 1/4 di quello iniziale, l'impatto inerziale è il meccanismo di deposizione dominante. Modificata da [12].

disomogeneità scintigrafica di distribuzione della ventilazione polmonare correla infatti con la riduzione degli indici funzionali di ostruzione (12).

La tecnica dei radioaerosol per lo studio del trasporto mucociliare in vivo

Consiste nella inalazione di un aerosol marcato con isotopi gamma emittenti e sulla successiva rilevazione dell'attività mediante gammacamera planare. Dopo la nebulizzazione di aerosol mono- o eterodispersi di particelle marcate con isotopi gamma emittenti a volume corrente in posizione seduta, il paziente viene posizionato sotto la gamma-camera per la registrazione delle immagini.

Il trasporto mucociliare può essere determinato mediante brevi acquisizioni statiche ad intervalli regolari di tempo o mediante acquisizioni di tipo dinamico. Dopo aver corretto per la quota di decadimento fisico dell'isotopo, l'attività di clearance biologica viene espressa come percentuale dell'attività inizialmente deposta nel tempo o come curve attività-tempo. Queste ultime possono venir analizzate con modelli di tipo esponenziale su cui si calcola il tempo di dimezzamento ($T_{1/2}$), cioè il tempo nel quale l'attività si riduce al 50% dell'attività iniziale.

Nella figura 2 è rappresentato un esempio schematico dell'andamento esponenziale della fase rapida di trasporto lungo l'albero tracheobronchiale e della fase lenta alveolare.

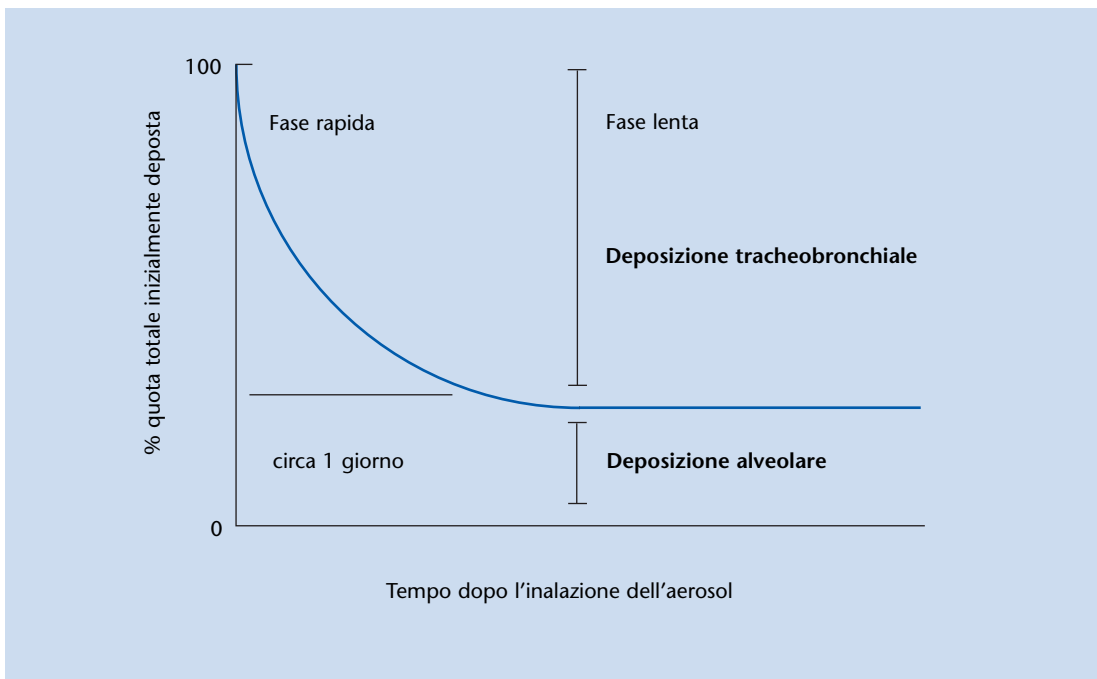


Figura 2 Rappresentazione schematica dell'andamento esponenziale del trasporto mucociliare. Sono indicate la fase rapida della clearance tracheo-bronchiale e la fase lenta della clearance alveolare.

Il metodo di analisi delle immagini dinamiche

Il metodo sviluppato nel nostro laboratorio (13) consiste nell'acquisizione di immagini in *frame* di 1 minuto ciascuno, consecutivamente per 75 minuti. I pazienti vengono invitati a tossire al 60°, 65°, 70°, 75° minuto di acquisizione. Per valutare il TMC spontaneo e il TMC durante tosse i primi 60 *frames* e gli ultimi 15 *frames* vengono analizzati separatamente.

Le curve attività-tempo vengono calcolate sul polmone destro, dopo correzione dell'attività per il decadimento e normalizzazione dei conteggi. I punti ricavati da queste curve vengono fittati tra il tempo $T=0$ e $T=40$ minuti con una funzione esponenziale. Il $T_{1/2}$ di questa funzione è l'indice con cui esprimiamo la velocità del trasporto mucociliare. L'analisi può anche essere eseguita a livello regionale o separatamente su entrambi i polmoni.

La *figura 3* illustra il metodo di analisi utilizzato nel nostro laboratorio. Le immagini si riferiscono al caso di una bambina di 12 anni con bronchiectasie del lobo inferiore destro e Sindrome delle ciglia immobili. Il trasporto mucociliare calcolato sul polmone destro espresso come $T_{1/2}$ è molto rallentato ($T_{1/2} = 929.47$ minuti). In *figura 4* ci sono le immagini relative ad un bambino di 8 anni, con bronchiectasie di origine acquisita a livello del lobo inferiore del polmone destro. Il valore del $T_{1/2}$, pari a 353.86 minuti, rientra nel *range* dei valori misurati nel nostro laboratorio in un gruppo di soggetti normali adulti (13).

La variabilità del trasporto mucociliare misurato con la tecnica dei radioaerosol

È una stima della variabilità biologica e della variabilità metodologica, che deriva dalle differenze nella distribuzione iniziale del radioaerosol entro i polmoni. La variabilità interindividuale può essere espressa in termini di coefficiente di variazione (CoV), cioè $DS/media \times 100$. Tale indice può risultare sensibilmente diverso a seconda che si valutino curve di ritenzione o curve di deposizione.

Prendendo in esame i dati di soggetti normali e di vari gruppi di pazienti, pubblicati in letteratura, si può concludere che la variabilità interindividuale non è molto grande. Nei soggetti normali non

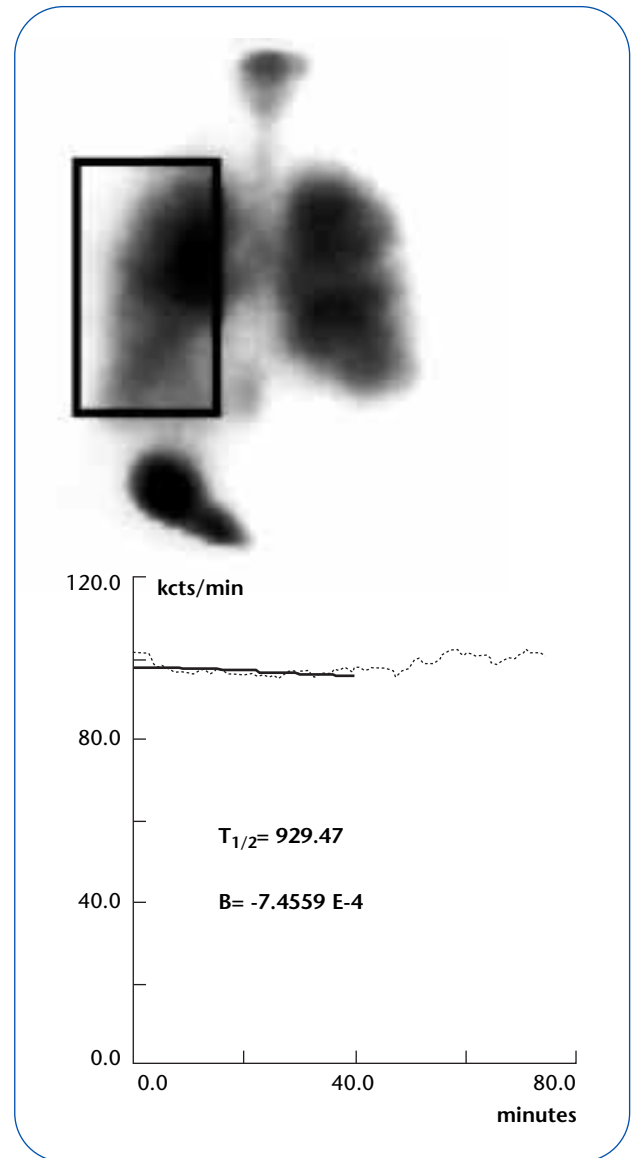


Figura 3 Analisi del trasporto mucociliare [13] in una bambina di 12 anni con bronchiectasie a livello del lobo inferiore destro e Sindrome delle ciglia immobili. L'indice che esprime la velocità del trasporto mucociliare è il $T_{1/2}$, cioè il tempo nel quale l'attività si riduce al 50% di quella iniziale. I valori misurati nel nostro laboratorio in un gruppo di 8 adulti asintomatici non fumatori sono risultati 338 ± 182 minuti. In questa paziente il $T_{1/2}$ è 929.27 minuti. Per i dettagli dell'analisi vedere testo.

fumatori il coefficiente di variazione interindividuale è del 13%, mentre nei pazienti varia dal 28 al 39% (14).

Molti fattori contribuiscono alla variabilità della misura. Essi vanno inquadrati in un contesto generale, che valuti le differenze legate alla metodologia, al tipo di patologia ed alla severità della lesione. Tuttavia, in pazienti con bronchite cronica

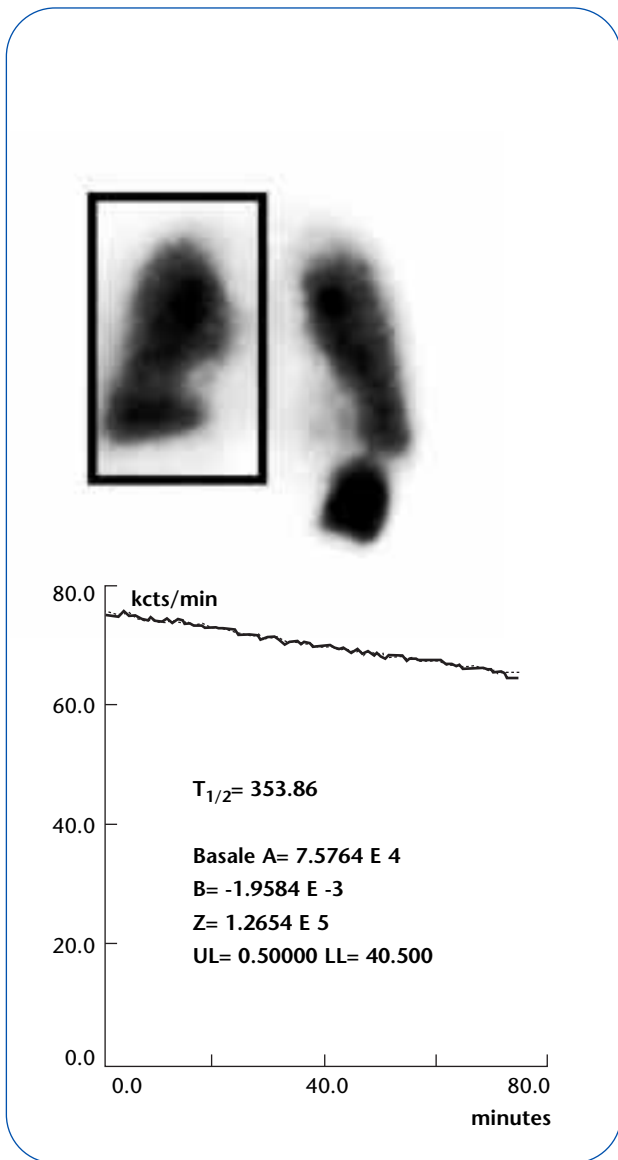


Figura 4 Analisi del trasporto mucociliare [13] in un bambino di 8 anni con bronchiectasie a livello del lobo inferiore destro di origine acquisita. L'indice che esprime la velocità del trasporto mucociliare è il $T_{1/2}$, cioè il tempo nel quale l'attività si riduce al 50% di quella iniziale. I valori misurati nel nostro laboratorio in un gruppo di 8 adulti asintomatici non fumatori sono risultati 338 ± 182 minuti. In questo paziente il $T_{1/2}$ è 353.86 minuti. Per i dettagli dell'analisi vedere testo.

ed asma bronchiale, il CoV interindividuale è indipendente dalla tosse e dalla deposizione iniziale delle particelle (14).

La riproducibilità dei risultati ottenuti studiando lo stesso paziente a tempi diversi è buona (15). Questo rende la tecnica idonea per valutare la risposta a trattamenti farmacologici.

○ La tecnica dei radioaerosol: applicazioni diagnostiche e cliniche

- ✓ Effetto di fattori fisiologici
- ✓ Effetto di inquinanti atmosferici
- ✓ Effetto di agenti farmacologici
- ✓ Asma bronchiale
- ✓ Bronchite e bronchiectasie
- ✓ Effetto di anomalie congenite delle ciglia
- ✓ Effetto di alterazioni acquisite delle ciglia
- ✓ Meccanismi di controllo

La tecnica dei radioaerosol può dunque essere impiegata per vari scopi, tra i quali quello di valutare il rallentamento del trasporto mucociliare in corso di alterazioni primitive della struttura ciliare e di patologie acquisite.

È noto che patologie congenite come la Sindrome delle ciglia immobili, la Sindrome di Kartagener, o la discinesia ciliare primaria aboliscono o deprimono il trasporto mucociliare, favorendo la stasi di muco e le infezioni ricorrenti. Un certo grado di motilità ciliare può essere presente nei pazienti con discinesia ciliare primaria, i quali presentano una sintomatologia clinica più sfumata.

Camner e coll. (16) hanno studiato il ruolo della clearance tracheobronchiale nella diagnosi differenziale dei pazienti con Sindrome delle ciglia immobili, confrontando 20 pazienti con sintomatologia e storia clinica tipica e 8 pazienti con sospetto di discinesia ciliare primaria, storia clinica non tipica e sintomatologia più sfumata. Tutti i pazienti con storia clinica tipica mostravano valori di trasporto molto più alterati rispetto ai pazienti con storia clinica non tipica.

Nelle bronchiectasie, la clearance del muco può essere normale o molto rallentata (17). Camner e Mossberg (18), hanno suggerito, che in un sottogruppo di pazienti con alterazioni congenite ed acquisite il disturbo del trasporto mucociliare sia la causa dello sviluppo delle bronchiectasie.

Nella fibrosi cistica le alterazioni dell'epitelio alla permeabilità del Cl^- e all'assorbimento del NA^+ determinano la produzione di secrezioni dense e vischiose tanto da alterare l'efficienza del trasporto mucociliare favorendo la suscettibilità alle infezioni da Stafilococco Aureo e da *Pseudomonas Aeruginosa*. Questi pazienti sviluppano bronchiectasie ed ostruzione cronica delle vie aeree. App e coll. (19) hanno notato che la clearance mucociliare

era basamente più lenta nei pazienti di età <14 anni, rispetto ai pazienti di età >14 anni, suggerendo un effetto di maturazione del meccanismo di trasporto del muco.

Le infezioni acute del tratto respiratorio svolgono un ruolo importante nel deprimere la funzionalità delle ciglia (20, 21). Gli agenti virali agiscono in genere con un meccanismo citotossico diretto sull'epitelio delle vie aeree, mentre gli agenti batterici deprimono la funzione ciliare attraverso la produzione di sostanze specifiche come ad esempio la piocianina.

Conclusioni

In conclusione, nessuna delle tecniche per lo studio del trasporto mucociliare è ideale. Tutte le tecniche che misurano la velocità del muco tracheale hanno il vantaggio di richiedere un breve periodo di osservazione, forniscono misure ripetibili relative ad una sede anatomica definita e presentano minimi artefatti dovuti alla tosse. Tra esse, la tecnica del bolo di radioaerosol è la meno invasiva. La tecnica cinebroncoscopica e quella radiologica per la loro invasività non sono proponibili nei bambini. D'altra parte i risultati ottenuti sulla trachea non sono estrapolabili a bronchi e piccole vie aeree.

Nello studio della patologia pediatrica, la tecnica dei radioaerosol *in vivo* è forse quella più utile. Sebbene il periodo di osservazione sia lungo ed i risultati vadano corretti per la tosse, essa fornisce informazioni sulla funzione del trasporto mucociliare dell'intero apparato respiratorio.

Il metodo di analisi che noi proponiamo quantizza il tempo di trasporto mucociliare mediante un indice, il $T_{1/2}$, che dà un'ottima riproducibilità tra gli operatori e sembra rappresentare bene la progressione dei boli, ispettivamente valutabile dalla sequenza delle immagini dinamiche.

La disponibilità di sofisticate tecniche di analisi morfologica ed ultrastrutturale dell'apparato ciliare rende necessario l'uso di una metodica di indagine clinica per la selezione dei pazienti con infezioni ricorrenti ed ostruzione delle vie aeree da indirizzare verso le indagini morfologiche ed ultrastrutturali. Per migliorare ed estendere l'uso di tale tecnica, si rende necessaria una standardizzazione della metodica, che permetta di rendere confrontabili i risultati ottenuti da diversi centri, con l'auspicabile obiettivo di correlare i dati funzionali con le alterazioni morfologiche ed ultrastrutturali delle ciglia, che rimangono ancora oggi un campo poco esplorato.

Bibliografia

1. Newhouse M, Sanchis J, Bienenstock J. *Lung defense mechanisms*. N Engl J Med 1976; 295: 990-998.
2. Sleight MA, Black JR, Liron N. *State of the art. The propulsion of mucous by cilia*. Am Rev Respir Dis 1988; 137: 726-741.
3. Leith DE. *Cough*. Phys Ther 1968; 48: 439-447.
4. Jones JG. *Clearance of inhaled particles from the alveoli*. In: Clarke SW, Pavia D (eds). "Aerosols and the lung: Clinical and experimental aspects". London: Butterworth 1984; pp. 170-196.
5. Camner P. *Clearance of particles from the human tracheobronchial tree*. Clin Sci 1980; 59: 79-84.
6. Sanchis J, Dolovich M, Chalmers R, Newhouse M. *Quantitation of regional aerosol clearance in the normal human lung*. J Appl Physiol 1972; 34: 757-762.
7. Lippmann M, Albert RE, Yeates DB, et al. *Factors affecting tracheobronchial mucociliary transport*. Inhaled Part 4 Pt. 1975; 1, 305-319.
8. Pavia D, Bateman JRM, Clarke SW. *Deposition and clearance of inhaled particles*. Bull Europ Physiopat Respir 1975; 16: 335-366.
9. Gamsu G, Weintraub RM, Nadel JA. *Clearance of tantalum from airways of different caliber in man evaluated by a roentgenographic method*. Am Rev Respir Dis 1973; 107: 214-224.
10. Friedman M, Stott FD, Poole DO, et al. *A new roentgenographic method for estimating mucous velocity in airways*. Am Rev Respir Dis 1977; 115: 67-72.
11. Yeates DB, Aspin N, Levinson H, et al. *Mucociliary tracheal transport rates in man*. J Appl Physiol 1975; 38: 487-495.
12. Santolicandro AM, Ruschi S, Fornai E, Giuntini C. *Imaging of ventilation in chronic obstructive pulmonary disease*. J Thorac Imag 1986; 1 (2): 36-53.
13. Santolicandro AM, Baldi S, Giuntini C. *The effect of a new expectorant drug on mucus transport in chronic bronchitis*. J Aeros Med 1995; 8: 33-42.
14. Del Donno M, Pavia D, Agnew JE, et al. *Variability and reproducibility in the measurement of tracheobronchial clearance in healthy subjects and patients with different obstructive lung diseases*. Eur Respir J 1988; 1 (7): 613-620.
15. Van Hengstum M, Festen J, Buijjs W, et al. *Variability of tracheobronchial clearance in healthy non smoking subjects*. Respiration 1989; 56: 94-102.
16. Camner P, Mossberg B, Afzelius BA. *Measurements of tracheobronchial clearance in patients with immotile-cilia syndrome and its value in differential diagnosis*. Eur Respir J 1983; 64 Suppl 127: 57-63.
17. Svartengren M, Mossberg B, Philipson K, Camner P. *Mucociliary clearance in relation to clinical features in patients with bronchiectasis*. Eur J Respir Dis 1986; 68: 267-278.
18. Camner P, Mossberg B. *Airway mucus clearance and mucociliary transport*. In: Morèn F, Dolovich MB, Newhouse MT, et al. (eds). "Aerosol in medicine. Principles, diagnosis and therapy". Amsterdam: Elsevier 1993; pp. 247-260.
19. App EM, King M, Helfesrieder R, et al. *Acute and long term amiloride inhalation in cystic fibrosis lung disease. A rational approach to cystic fibrosis or chronic bronchitis: the effect of aging*. Eur Respir J 1988; 1: 250s.
20. Lindberg S. *Morphological and functional studies of the mucociliary system during infections in the upper airways*. Acta Otolaryngol 1994; 515: 22-25.
21. Pavia D. *Acute respiratory infections and mucociliary clearance*. Eur J Respir Dis 1987; 219-226.

Il trattamento della discinesia ciliare primaria in età pediatrica

Treatment of primary ciliary dyskinesia in children

Parole chiave: discinesia ciliare primaria; fisioterapia respiratoria; broncodilatatori; antibiotici; vaccini; terapia chirurgica

Key words: *primary ciliary dyskinesia; respiratory physiotherapy; bronchodilators; antibiotics; vaccines; surgery*

Riassunto. Attualmente non sono disponibili trattamenti specifici in grado di correggere la disfunzione ciliare propria della Discinesia Ciliare Primaria (DCP). Risulta quindi importante l'applicazione della fisioterapia respiratoria che si propone sia di favorire la *clearance* delle vie aeree con effetti antiostruttivi e di ritardo del danno tissutale, sia di migliorare l'accesso alla superficie della mucosa bronchiale dei farmaci utilizzati per via inalatoria. Tra questi si ricorda come i beta2-agonisti si siano dimostrati in grado di stimolare il battito ciliare *in vitro* e di incrementare la *clearance* mucociliare, anche se non è stata documentata la loro efficacia clinica nei soggetti con alterazioni ciliari. Può trovare impiego anche l'ipratropium bromuro, poiché sarebbe in grado di ridurre le secrezioni nasali e delle basse vie aeree. La via aerosolica può essere utilizzata anche per la somministrazione di antibiotici, utili nel controllo dell'infezione cronica. La somministrazione preventiva di antibiotici *per os* è invece abitualmente impiegata nelle forme più severe, a cicli oppure in via continuativa. Una protezione ulteriore nei riguardi delle infezioni può essere ottenuta attraverso la somministrazione sistematica di vaccini verso numerosi patogeni respiratori. L'intervento chirurgico, infine, viene indicato solo nel trattamento di particolari complicazioni.

Summary. *To date no specific treatments are available to correct the ciliary dysfunction that occurs in Primary Ciliary Dyskinesia (PCD). It is therefore important the use of respiratory physiotherapy aimed to favour airways clearance, thus preventing obstruction and tissular damage and improving the access of inhalatory drugs to the bronchial mucosa. Among the latter it should be mentioned that beta2-agonists are able to stimulate ciliary motion in vitro and to improve mucociliary clearance, although their clinical effectiveness has not been proved in patients with ciliary abnormalities. Ipratropium bromure may be used as well since it seems to reduce nasal and lower airways secretion.*

Antibiotics administered as aerosol are useful to control chronic inflammation. Preventive administration of antibiotics per os, on the contrary, is usually advocated in severe conditions either as cyclic or continuous administration. A further protection against infections can be ensured by systematically using vaccines against respiratory pathogens. Finally, surgical intervention is only indicated for treating specific complications.

Corrispondenza: Dott. Massimo Pifferi - Fisiopatologia Respiratoria ed Allergologia - U.O. Pediatria I, Dipartimento Medicina della Procreazione e dell'Età Evolutiva - Università di Pisa, via Roma 67 - 56126 Pisa; e-mail: m.pifferi@med.unipi.it

Attualmente non sono disponibili trattamenti specifici in grado di correggere la disfunzione ciliare che è alla base delle manifestazioni presenti nella Discinesia Ciliare Primaria (DCP).

Pertanto il nostro intervento dovrebbe essere finalizzato a rimuovere le secrezioni, che ristagnando nelle vie aeree favoriscono il ripetersi di processi infettivi responsabili sia del danno strutturale che del decadimento della funzione respiratoria e quindi della progressione della malattia (1).

L'accumulo delle secrezioni infatti incrementa la resistenza al flusso aereo e il lavoro respiratorio,

essendo potenzialmente causa di iperinsufflazione e/o atelectasia, mal distribuzione della ventilazione ed alterazione del rapporto ventilazione/perfusione (2). Inoltre facilita la moltiplicazione dei germi che con le risposte infiammatorie da parte dell'ospite determinano il rilascio di enzimi proteolitici che danneggiano l'epitelio della parete delle vie aeree (3).

Risulta quindi di primaria importanza l'applicazione di misure fisioterapiche che si propongano di favorire la *clearance* delle vie aeree con effetti antiostruttivi e di ritardo del danno tissutale.



Figura 1 Drenaggio posturale nel bambino piccolo. Da *Terapia Fisica Respiratoria - Centro Regionale Fibrosi Cistica, Verona 1981*.

Un ulteriore beneficio della fisioterapia respiratoria sarebbe poi quello di migliorare l'accesso alla superficie mucosa dei bronchi con una più ampia penetrazione dei medicinali utilizzati per via inalatoria (2).

In particolare è importante procedere alla disostruzione delle alte vie aeree attraverso una toilette accurata delle fosse nasali con l'impiego di lavaggi a base di soluzioni saline. A questo scopo sarà necessario che esse siano erogate con una leggera pressione, alternativamente nelle due narici, dopo aver reclinato posteriormente il capo del bambino mantenuto in posizione ortostatica. Le secrezioni rese più fluide devono poi essere rimosse con un apposito aspiratore se il bambino

non è in grado di eliminarle spontaneamente (4). Per raggiungere questo obiettivo sarà opportuno insegnare al bambino, quando possibile, a soffiarsi correttamente il naso e cioè una narice per volta (premendo la controlaterale) a bocca chiusa (4). È poi consigliabile non soffiare energicamente il naso per non favorire la disseminazione delle secrezioni nei seni paranasali o l'ostruzione delle tube (4). Un metodo alternativo, da ritenere sicuramente più pratico ed efficace, è rappresentato dall'impiego di appositi strumenti (Rinowash, Rinoflow) che, consentendo di eseguire docce nasali micronizzate, favoriscono il drenaggio anteriore delle secrezioni (5).

In particolare può essere utilizzato il drenaggio posturale che mira ad ottenere la mobilizzazione ed il trasporto delle secrezioni utilizzando la forza di gravità (2). A tale scopo il bambino viene posizionato in modo da drenare ogni segmento o gruppo di segmenti polmonari interessati dal ristagno di muco, utilizzando nel bambino più grande un piano rigido opportunamente inclinato o tenendo il lattante semplicemente sulle ginocchia (*Figura 1*) (6). Tali posizioni sono state stabilite sulla base dell'esperienza ed in considerazione dell'anatomia dell'albero bronchiale (6).

Il muco viene quindi sollecitato da percussioni e vibrazioni esercitate sulla parete toracica. Le prime, ottenute con la mano atteggiata a piccola o grande coppa (in modo che una quantità di aria attenni il contatto tra il palmo della mano e la superficie toracica) (*Figura 2*) determinano uno scollamento delle secrezioni dalle pareti bronchiali (7, 8). Le vibrazioni, ottenute applicando le mani sulla parete toracica durante la fase espiratoria, vengono utilizzate allo stesso scopo e in associazione con le

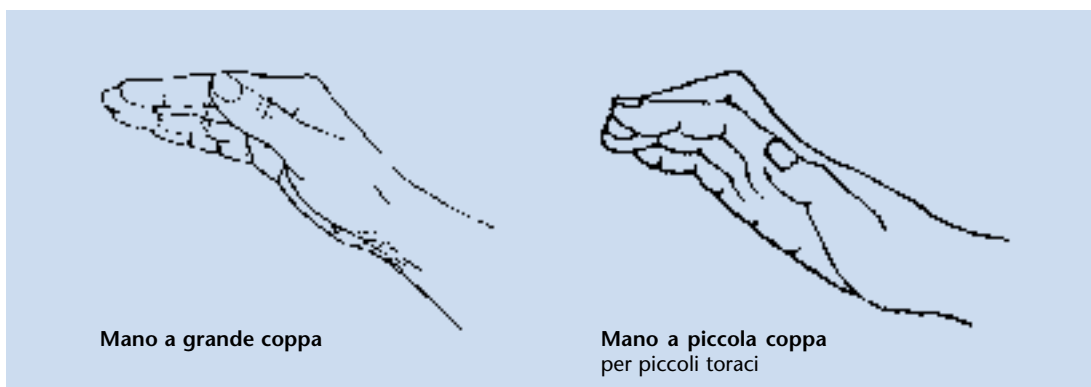


Figura 2 Atteggiamento della mano per eseguire la percussione. Da *Terapia Fisica Respiratoria - Centro Regionale Fibrosi Cistica, Verona 1981*.

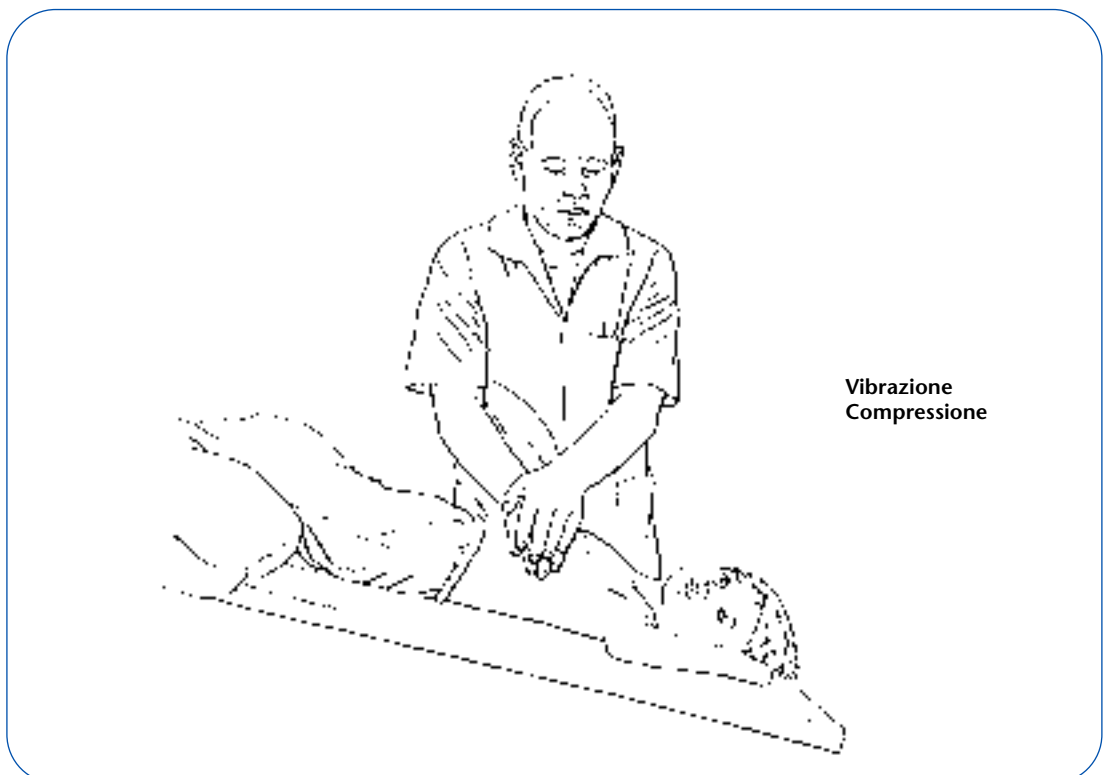
precedenti (Figura 3) (9). Va comunque sottolineato che, mentre il valore terapeutico del drenaggio posturale è stato stabilito da studi eseguiti in pazienti adulti, non è ancora accertato quanto questi risultati possano essere riprodotti in età pediatrica, sebbene l'esperienza clinica deponga per una sua efficacia (2). Vi è da ritenere infatti che la mancanza di risultati derivi soprattutto dalla difficoltà di un accurato monitoraggio degli eventuali progressi sul piano clinico dei piccoli pazienti.

Ad ogni modo, è stato documentato che il drenaggio posturale è in grado di migliorare la funzione polmonare (10, 11). Anche riguardo all'efficacia delle percussioni mancano studi conclusivi, ma l'esperienza in età pediatrica appare essere più positiva facendo supporre una perdita progressiva del suo valore terapeutico con l'incremento dell'età (2).

Per mobilizzare le secrezioni soprattutto nei distretti bronchiali più centrali è possibile inoltre un impiego opportuno della tosse posta sotto il controllo della volontà (12). Infatti, se i colpi di tosse vengono eseguiti in sequenza sono in grado di drenare porzioni sempre più distali delle vie aeree, determinandone una spremitura progressiva (12).

In tal modo il punto di egual pressione, ovvero il punto in cui la pressione all'esterno del bronco (pressione pleurica) uguaglia quella all'interno (pressione pleurica più pressione elastica), col procedere dell'espirazione, si sposta verso la periferia e con esso il punto di collabimento (Figura 4) (13). Tuttavia va sottolineato che la tosse non è in grado di drenare le piccole vie aeree poiché il flusso di aria e quindi il potere espulsivo della tosse è inversamente proporzionale al calibro globale delle stesse ed alla periferia la superficie di sezione di tutte le vie aeree supera di gran lunga quella delle prime diramazioni bronchiali (13, 14).

Nel bambino più grande può essere applicata con successo anche la Tecnica della Espirazione Forzata (FET) facendo eseguire un'inspirazione di volume medio ed un'espirazione forzata attraverso la glottide aperta (*huff*) o semichiusa (2, 12). Tale tecnica utilizza quindi i flussi aerei espiratori per mobilizzare e trasportare le secrezioni, applicando come nel caso della tosse le conoscenze relative alla fisiologia della espirazione forzata. Purtroppo, però, anche in questo caso la sua efficacia nel rimuovere le secrezioni si riduce progressivamente dalle vie aeree centrali a quelle periferiche (14). Può inoltre



**Vibrazione
Compressione**

Figura 3 Manovra per eseguire la vibrazione. Da *Terapia Fisica Respiratoria - Centro Regionale Fibrosi Cistica, Verona 1981*.

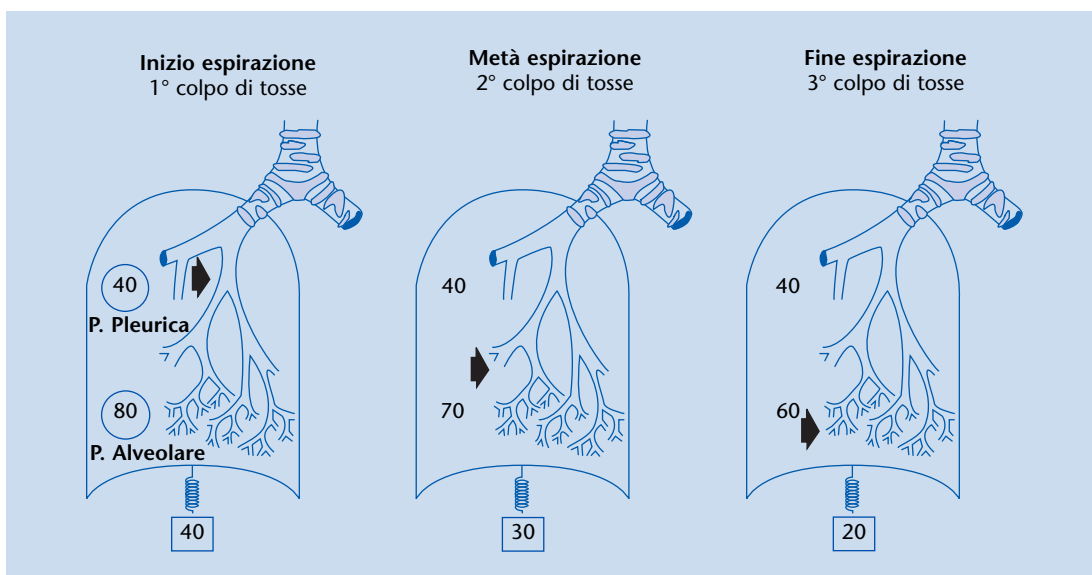


Figura 4 I colpi di tosse in sequenza possono drenare porzioni sempre più distali delle vie aeree, determinandone una spremitura progressiva. In tal modo il punto di egual pressione col procedere della espirazione si sposta verso la periferia e con esso il punto di collabimento. Modificato da [13].

essere impiegata la PEP Mask che, utilizzando il respiro diaframmatico, prevede un'espirazione contro resistenza, attiva ma non forzata, fino alla capacità funzionale residua dopo un'inspirazione maggiore del volume corrente, in modo da ottenere un prolungamento della fase espiratoria (6, 12). Si ritiene che tale manovra possa determinare una onda pressoria di ritorno in grado di mantenere pervie vie aeree instabili. Questa teoria è sostenuta dalla recente dimostrazione di una marcata attenuazione della compressione dinamica delle vie aeree (15). Si comprende quindi perché la PEP Mask trovi impiego nel trattamento di pazienti con malattia polmonare di tipo ostruttivo complicata da instabilità delle pareti delle vie aeree come in presenza di bronchiectasie. La terapia con la PEP Mask è in grado inoltre di facilitare la mobilizzazione espiratoria del muco mediante l'incremento di flussi aerei collaterali verso distretti precedentemente non ventilati, le cui vie aeree siano ostruite da secrezioni (Figura 5) (2, 6). Infine può essere utilizzato con successo il Flutter sia nei bambini in età prescolare, se adeguatamente assistiti, sia nelle età successive. Il suo impiego determina nel corso dell'espirazione una pressione positiva di tipo oscillatorio all'interno delle vie aeree indipendentemente dal flusso, il cui effetto è quello di mantenere pervie più a lungo le vie aeree evitando il collasso bronchiale nelle zone con pareti danneggiate ed instabili (2, 6, 12). Inoltre

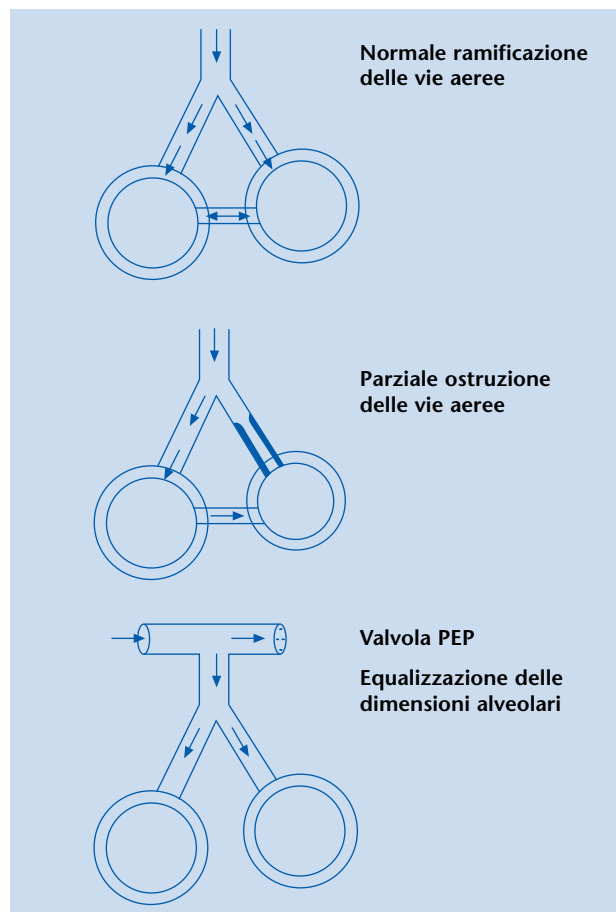


Figura 5 Meccanismi mediante i quali la PEP rende possibile la ventilazione di zone polmonari periferiche attraverso le vie collaterali. Modificato da [6].

provoca variazioni oscillatorie della pressione positiva endobronchiale che favoriscono il distacco e l'eliminazione del muco dalle pareti bronchiali (2). La modulazione della pressione e del flusso espiratorio viene ottenuta inclinando in maniera diversa l'apparecchio (16).

Insieme alla fisioterapia è importante considerare l'utilità della terapia farmacologica. A tale scopo si ricorda come i beta2-agonisti e le xantine si siano dimostrati in grado di stimolare il battito ciliare *in vitro* e di incrementare la *clearance* mucociliare nei pazienti, anche se la loro efficacia nella pratica clinica in soggetti con alterazioni ciliari non è stata documentata (17-19). L'ipratropium bromuro può essere utilizzato allo stesso scopo, tanto più che tale principio attivo può ridurre le secrezioni nasali e delle basse vie aeree favorite dalla stimolazione parasimpatica delle ghiandole sottomucose (17). In particolare si sottolinea l'importanza di somministrare un broncodilatatore per via aerosolica prima di ogni seduta fisioterapica allo scopo di aumentarne l'efficacia. Dopo aver mobilizzato le secrezioni, la via aerosolica può essere utilizzata anche per la somministrazione di antibiotici per il controllo dell'infezione cronica, dato che il danno polmonare progressivo solitamente inizia da un'infezione in aree polmonari ostruite (2). Il trattamento antibiotico, quindi, non deve essere inteso come alternativo alla fisioterapia, ma da associare a questa (18-22). I farmaci più frequentemente utilizzati per via aerosolica sono gli aminoglicosidi da soli o in combinazione con i beta-lattamici (23).

La somministrazione preventiva di antibiotici *per os* è abitualmente impiegata nelle forme più severe, a cicli oppure in via continuativa (20-23). È comunque essenziale non dimenticare che l'antibioticoterapia delle superinfezioni batteriche occupa un ruolo importante nella prevenzione del danno broncopolmonare irreversibile. Per una scelta appropriata della terapia antimicrobica è possibile ricorrere all'esame colturale dell'espettorato, quando il paziente è collaborante. Quando però non è possibile ottenere il campione, oppure permangono sintomi respiratori, dopo una terapia antibiotica, è necessario utilizzare antibiotici ad ampio spettro quali il trimethoprim-sulfametossazolo (18).

Per il ruolo fondamentale che riveste la tosse nel rimuovere le secrezioni bronchiali sarà opportuno evitare la somministrazione dei farmaci ad azione

sedativa (18). I mucolitici non si sono dimostrati efficaci nella DCP (24) sebbene sia stato prospettato l'impiego della N-acetilcisteina, così come di alcune vitamine (acido ascorbico, alfa-tocoferolo), nella prevenzione del danno polmonare ossidativo (25-29). In particolare per la N-acetilcisteina è stato dimostrato un effetto protettivo sul danno indotto dai prodotti tossici che si generano nel corso del processo di fagocitosi e di *killing* intracellulare dei batteri da parte dei macrofagi alveolari (30).

L'impiego degli steroidi nel trattamento della DCP non risulta ancora ben definito (18).

Una protezione ulteriore nei riguardi delle infezioni può essere ottenuta attraverso la somministrazione sistematica di vaccini verso numerosi patogeni respiratori, quali la *Bordetella pertussis*, l'*Haemophilus influenzae* tipo b, lo *Streptococcus pneumoniae*, il virus del morbillo e il virus dell'influenza (per quest'ultimo con cadenza annuale) (18). Dovremmo, inoltre, consigliare di evitare l'esposizione ai patogeni respiratori, al fumo di tabacco e ad altri inquinanti e irritanti che possono danneggiare la mucosa delle vie aeree e stimolare la secrezione di muco (18).

L'intervento chirurgico può essere indicato nel trattamento di particolari complicazioni.

La timpanostomia con posizionamento di un tubo di ventilazione possono essere necessari per controllare un'otite media sierosa cronica che persiste nonostante la terapia antibiotica (18).

La polipectomia nasale e/o il drenaggio sinusale possono essere utilmente impiegati in pazienti con sinusite severa che non risponde alla terapia antibiotica (18).

Anche la lobectomia può essere considerata in pazienti con bronchiectasie localizzate od atelettasie che siano ritenute la sorgente per infezioni croniche. Tuttavia, è necessario che la lobectomia sia considerata con cautela poiché ogni rimozione di tessuto polmonare funzionante in pazienti con malattia polmonare progressiva potrebbe avere conseguenze a lungo termine (18, 19).

Si deve ricordare infine come, nella gestione del bambino con problemi respiratori cronici quali quelli che si evidenziano nella DCP, risulti di fondamentale importanza far conoscere al paziente e alla famiglia i problemi connessi con la malattia allo scopo di ottenere una migliore *compliance* al trattamento.

Bibliografia

1. Ellerman A, Bisgaard H. *Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia*. Eur Respir J 1997; 10: 2376-2379.
2. Zach MS, Oberwaldner B. *Chest physiotherapy*. In: Taussig LM, Landau LI. "Pediatric Respiratory Medicine". St. Louis, Missouri: Mosby Inc. 1999; 299-311.
3. Zach MS. *Lung disease in cystic fibrosis: an updated concept*. Pediatr Pulmonol 1990; 8: 188-202.
4. Baldini G, Pifferi M. *Il trattamento sintomatico delle infezioni del tratto respiratorio superiore*. Omnia Medica et Therapeutica 1994; 1: 1-8.
5. Passali D, Bellussi L, Gorga FA. *Il trattamento delle rinopatie con doccia nasale micronizzata*. Riv Orl Aud Fon 1996; 4: 271-274.
6. Costantini D, Brivio A. *Indicazioni e modi della fisioterapia respiratoria nell'infanzia*. Aggiornamenti di fisiopatologia e terapia in pediatria 1997; 5: 12-23.
7. May DB, Munt PW. *Physiologic effects of chest percussion and postural drainage in patients with stable chronic bronchitis*. Chest 1979; 75: 29-32.
8. Bauer ML, McDougal J, Schoumacher RA. *Comparison of manual and mechanical chest percussion in hospitalized patients with cystic fibrosis*. J.Pediatr 1994; 124: 250-254.
9. Holody B, Goldberg HS. *The effect of mechanical vibration physiotherapy on arterial oxygenation in acutely ill patients with atelectasis or pneumonia*. Am Rev Respir Dis 1981; 124: 372-375.
10. Feldman J, Traver GA, Taussig LM. *Maximal expiratory flows after postural drainage*. Am Rev Respir Dis 1979; 239-245.
11. Webber BA, Hofmeyr JL, Morgan MDL, Hodson ME. *Effects of postural drainage: incorporating the forced expiration technique, on pulmonary function in cystic fibrosis*. Br J Dis Chest 1986; 80: 353-359.
12. Gremmo M, Guenza MC. *Riabilitazione respiratoria in età evolutiva*. In Rossi G.: *Pneumologia pediatrica*. Milano: McGraw Hill Libri Italia srl 1998; 487-496.
13. Battistini A. *La fisiochinesiterapia respiratoria. Aspetti fisiopatogenetici e indicazioni cliniche*. Riv Ital Ped 1984; 10: 220-225.
14. Hasani A, Pavia D, Agnew JE, Clarke SW. *Regional lung clearance during cough and forced expiration technique (FET): effects of flow and viscoelasticity*. Thorax 1994; 49: 557-561.
15. Al-Nahas A, Hoffmeyer B, Takis C, et al. *Dynamic airway compression limiting forced vital capacity is attenuated by positive airway pressure in severe cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med 1994; 149: A675.
16. Konstan MW, Stern RC, Doershuk CF. *Efficacy of the flutter device for airway mucus clearance in patients with cystic fibrosis*. J Pediatr 1994; 124: 689-693.
17. Pavia D, Bateman JR, Sheahan NF, Clarke SW. *Clearance of lung secretions in patients with chronic bronchitis: effects of terbutaline and ipratropium bromide aerosols*. Eur J Respir Dis 1980; 61: 245-253.
18. Leigh MW. *Primary ciliary dyskinesia*. In: Chernick V, Boat TF. "Kendig's disorders of the respiratory tract in children". Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Co., 6th ed., 1998; 819-825.
19. Rutland J, de Longh R. *Ciliary dysfunction*. In: Taussig LM, Landau LI. "Pediatric respiratory medicine". St Louis, Missouri: Mosby Inc., 1999; 1171-1178.
20. Schidlow DV. *Primary ciliary dyskinesia (the immotile cilia syndrome)*. Ann Allergy 1994; 73: 457-469.
21. Bush A, Cole P, Hariri M, et al. *Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care*. Eur Respir J 1998; 12: 982-988.
22. Meeks M, Bush A. *Primary Ciliary Dyskinesia (PCD)*. Pediatr Pulmonol 2000; 29: 307-316.
23. Messori B. *Bronchiectasie*. In: Pozzi E, De Rose V. "Malattie respiratorie croniche ostruttive". Pavia, Italia: Edizioni Medico Scientifiche 1996; 109-129.

- 24.** Stafanger G, Garne S, Howitz P, et al. *The clinical effect and the effect on the ciliary motility of oral N-acetylcysteine in patients with cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia.* Eur Respir J 1988; 1: 161-167.
- 25.** Nagy AM, Vanderbist F, Parij N, et al. *Effect of the mucoactive drug nacistelyn on the respiratory burst of human blood polymorphonuclear neutrophils.* Pulm Pharmacol Ther 1997; 10: 287-292.
- 26.** Colome JA, Jorda J, Espinos D, et al. *Effect of N-acetylcysteine on the oxidative burst induced by phagocytosis of bacteria in human leukocytes.* Methods Find Exp Clin Pharmacol 1998; 20: 301-305.
- 27.** Rautalahti M, Virtamo J, Haukka J, et al. *The effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on COPD symptoms.* Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 1447-1452.
- 28.** Bouhafs RK, Jarstrand C. *Lipid peroxidation of lung surfactant by bacteria.* Lung 1999; 177: 101-110.
- 29.** Nowak D, Piasecka G, Antczak A, Pietras T. *Effect of ascorbic acid on hydroxyl radical generation by chemical, enzymatic and cellular systems. Importance for antioxidant prevention of pulmonary emphysema.* Biomed Biochim Acta 1991; 50: 265-272.
- 30.** Oddera S, Silvestri M, Sacco O, et al. *N-acetylcysteine enhances in vitro the intracellular killing of staphylococcus aureus by human alveolar macrophages and blood polymorphonuclear leukocytes and partially protects phagocytes from self-killing.* J Lab Clin Med 1994; 124: 293-301.

Nicola Oggiano, Stefano Bruni, Orazio Gabrielli, Giovanni V. Coppa

Istituto di Clinica Pediatrica Università degli Studi di Ancona

Infezioni Respiratorie Ricorrenti (I.R.R.) e Patologia Ciliare: attualità, controversie, prospettive future

Recurrent Respiratory Tract Infections and Ciliary Pathology in Children: Present, Different Opinions, Prospects for the future.

Parole chiave: Sindrome di Kartagener; Discinesia Ciliare Primaria (D.C.P.), Ossido Nitrico (N.O.), Infezioni Respiratorie Ricorrenti (I.R.R.)

Key words: *Kartagener's Syndrome, Primary Ciliary Dyskinesia, Nitric Oxide, Recurrent Respiratory Tract Infections*

Riassunto. La Sindrome di Kartagener (Situs Viscerum Inversus - SVI -, Bronchiectasie, Sinusite, più raramente polipi nasali ed agenesia dei seni frontali) costituisce un sottogruppo (approssimativamente il 50%) della Discinesia Ciliare Primaria (D.C.P.). La D.C.P. è un disordine genetico che comporta una Clearance Muco-Ciliare (C.M.C.) inefficace e, di conseguenza, flogosi ricorrenti e croniche del tratto aereo superiore ed inferiore.

È difficile stabilire la reale prevalenza della D.C.P. isolata, in assenza cioè di S.V.I.

È stato peraltro ipotizzato che alterazioni ciliari congenite possano sostenere le Infezioni Respiratorie Ricorrenti (I.R.R.) più spesso di quanto tradizionalmente ritenuto, anche se sono necessari ulteriori Studi per poter confermare tali ipotesi.

L'iter diagnostico "classico" della D.C.P. è piuttosto complesso ed invasivo, per cui è stata recentemente proposta la quantizzazione dell'Ossido Nitrico Esalato (E.N.O.) quale Test di Screening diagnostico; i livelli di N.O. riscontrabili nella D.C.P. (soprattutto nasali) sono infatti estremamente bassi.

Anche se i rapporti tra D.C.P. e N.O. sono meritevoli di ulteriori approfondimenti, la valutazione di E.N.O., in quanto relativamente facile e soprattutto non invasiva, si prospetta dunque quale test utile nel selezionare i pazienti da sottoporre a Biopsia o Brushing della mucosa respiratoria, unitamente ad altri elementi clinici e strumentali.

Esistono tuttavia ancora delle difficoltà applicative, legate fondamentalmente all'età, che si scontrano con l'esigenza di una diagnosi precoce di D.C.P., essenziale invece per prevenire la formazione di bronchiectasie.

Summary. *Kartagener's Syndrome (Situs Viscerum Inversus - SVI -, Bronchiectasis, Sinusitis, infrequently nasal polyps and frontal sinus agenesis) represents a sub-group (approximately 50%) of Primary Ciliary Dyskinesia (P.C.D.).*

P.C.D. is a genetic disorder involving an ineffective Mucociliary Clearance and consequently recurrent and chronic upper and lower respiratory diseases.

It's difficult to define the real prevalence of isolated P.C.D. without S.V.I.

However it has been hypothesised that congenial ciliary alterations may support Recurrent Respiratory Infections (R.R.I.) more than traditionally believed, even if further studies are necessary to confirm this hypothesis.

Because of the standard diagnostic procedure of P.C.D. is somewhat complex and invasive, the quantifications of Exhaled Nitric Oxide (E.N.O.) has been recently proposed as diagnostic Screening Test; Nitric Oxide levels founded in P.C.D. (above all nasal ones) are in fact very low.

Even if relations between P.C.D. and N.O. deserve to be closely examined, E.N.O. evaluation, being relatively easy and above all not invasive, may represent an useful test in order to select patients to submit to Biopsy or Brushing of respiratory mucosa, together with other clinical and instrumental elements.

However, there are difficulties of application, above all linked to age, colliding with the need of an urgent diagnosis of P.C.D., essential to prevent the formation of Bronchiectasis.

Corrispondenza: Dott. Nicola Oggiano, Clinica Pediatrica c/o Azienda Ospedaliera "G. Salesi", via Corridoni 11, Ancona; e-mail: clipedan@indi.it

Dalla Sindrome di Kartagener alla DCP: l'evoluzione dinamica del problema

Fino a qualche tempo fa le alterazioni della cinetica ciliare venivano identificate con alcune particolari sindromi. Oggi si conoscono invece forme di

Discinesia Ciliare Primaria (DCP) con espressione fenotipica variabile, che non necessariamente comportano elementi clinici tali da configurare una delle sindromi note del passato (Sindrome di Kartagener; Sindrome sinu-bronchiale, Sindrome di Young, Sindrome di Mounier-Kuhn, etc.) (1, 2, 3).

Vari studi genetici ed epidemiologici hanno contribuito a "svincolare" la DCP dalla presenza (totale o parziale) di Situs Viscerum Inversus (SVI). Anche se siamo ancora piuttosto lontani dal poter stabilire un preciso rapporto tra le due entità, si può oggi ragionevolmente affermare che la Sindrome di Kartagener costituisca un sottogruppo della DCP (approssimativamente il 50%) (3, 4, 5).

Più difficile invece stabilire una reale prevalenza della DCP. Gli studi epidemiologici da cui si potrebbero trarre delle deduzioni si basano sul riscontro radiografico, nella popolazione generale, di SVI con frequenza 1:10000 e di Sindrome di Kartagener (SVI associato a bronchiectasie) con frequenza 1:40000. Considerate le limitazioni delle tecniche radiografiche standard ad evidenziare le bronchiectasie e la possibilità che il danno bronchiectasico in alcuni soggetti con DCP non si sviluppi, o per lo meno si sviluppi in modo molto contenuto, ben si comprende come la prevalenza tradizionalmente dedotta (1:20000) della DCP possa essere ampiamente sottostimata (6).

Non mancano poi in letteratura segnalazioni evocative di come i difetti assonemici riscontrabili nella DCP possano talora esprimere un più diffuso difetto genetico che si estende ad altri settori cellulari (diversi dall'assonema), soprattutto quelli ad attività microtubulo-dipendente, quali ad esempio PMN (7, 8), sistema biliare (9), ependima cerebrale (10).

Molto più difficile poter dimostrare un comune denominatore tra la DCP ed altre patologie congenite, come nel caso da noi descritto (11) di una paziente affetta contemporaneamente da Sindrome di Kartagener e Sindrome di Turner. Per quanto interessante sotto il profilo genetico noi stessi siamo dell'opinione che tale evento eccezionale (un solo altro caso descritto in letteratura, 12) sia solamente il risultato di un'associazione casuale.

Dalla DCP alle IRR: le controversie

Parallelamente alle suddette ricerche a carattere epidemiologico e genetico, focalizzate essenzialmente sulla DCP, negli ultimi dieci anni si sono andati sviluppando una serie di studi incentrati su alcune alterazioni ciliari considerate in passato categoricamente acquisite. Più precisamente è stato prospettato che tali alterazioni possano non

sempre essere sicuramente acquisite e che possano invece giocare un ruolo di primo piano nella morbilità del bambino con Infezioni Respiratorie Ricorrenti (IRR).

È da tempo noto che virus, batteri, inquinanti atmosferici, possano danneggiare l'apparato ciliare in modo diretto o attraverso i mediatori e le cellule coinvolte nel processo flogistico (13-16).

È stato infatti più volte segnalato, anche da noi stessi, come alcune sostanze coinvolte nel processo infiammatorio (elastasi, proteasi, metaboliti dell'O₂, leucotrieni, PAF, etc.) possano indurre alterazioni funzionali ed ultrastrutturali dell'apparato ciliare (17-21).

È pertanto intuibile che in numerose affezioni respiratorie a carattere infettivo e/o flogistico (ad es. asma bronchiale) si possano riscontrare difetti ciliari talora piuttosto intensi, complessi e persistenti nel tempo, tali da poter facilmente indurre in dilemmi diagnostici. Notevoli difficoltà si possono infatti incontrare, soprattutto sotto il profilo morfologico, a distinguere forme congenite da forme acquisite.

Da un lato è vero che in passato è stato ben codificato come le alterazioni ciliari, perché possano essere interpretate come congenite, devono essere riscontrate in una percentuale molto alta di ciglia (superiore al 50%) e caratterizzate da una "monotonia" delle lesioni, nonché dalla loro persistenza nel tempo e da un coinvolgimento delle strutture "nobili" dell'assonema, soprattutto i bracci di dineina (1, 2).

È però altrettanto vero che a sostegno della DCP sono state descritte svariate alterazioni, che coinvolgono strutture talora diverse dai bracci di dineina, così come difetti di orientamento delle ciglia o addirittura una loro eccessiva lunghezza (4-6, 22, 23).

Ad aumentare la difficoltà diagnostica concorre il fatto che molto spesso nel paziente affetto da DCP si riscontrano lesioni squisitamente congenite commiste a lesioni tipicamente acquisite, stante il recidivare delle infezioni. Di qui l'esigenza di dover effettuare una valutazione, funzionale come strutturale, a distanza di almeno 4-6 settimane dalla risoluzione di un episodio infettivo (6).

Il problema assume particolare rilevanza di fronte al bambino con IRR che, come noto, costituisce una delle problematiche più frequenti cui deve far fronte il pediatra nella sua attività quotidiana. La maggior parte degli Autori che si sono interessati

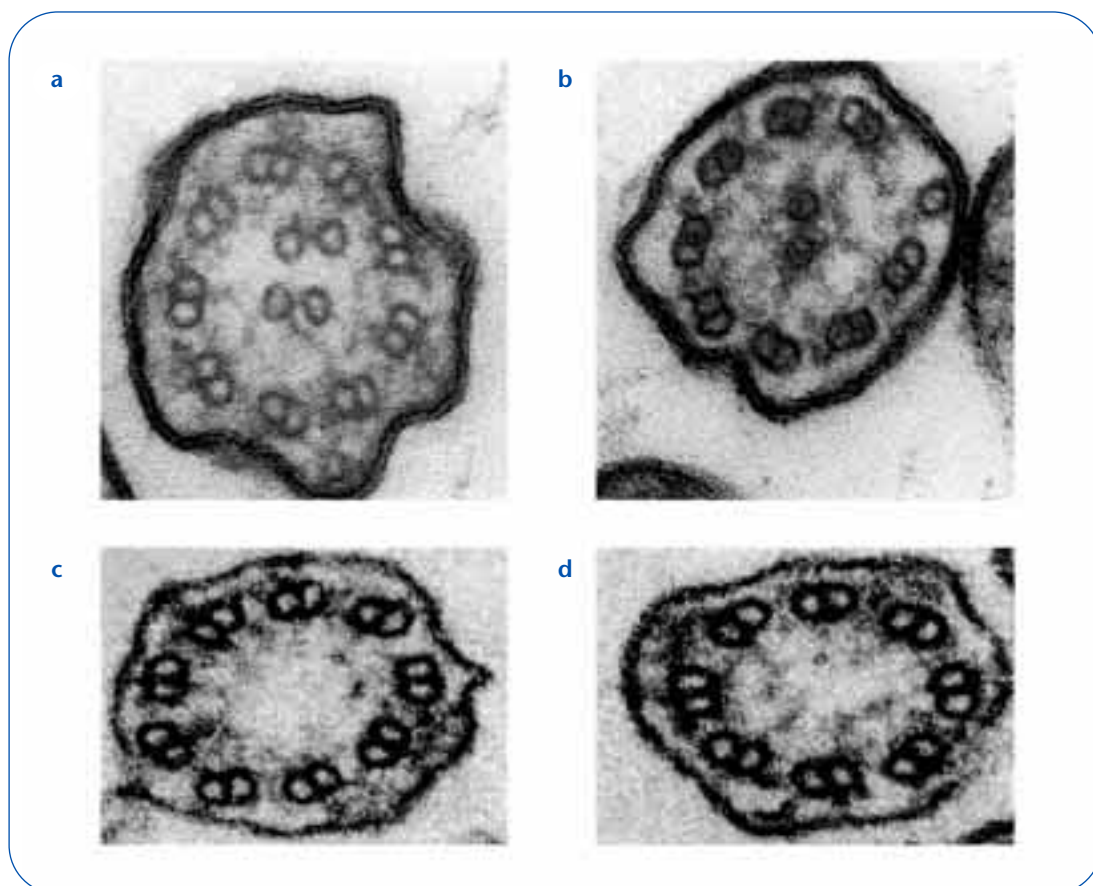


Figura 1 Microscopia elettronica a trasmissione (ingrandimento x 120000). **a**, presenza di una coppia di tubuli centrali sovrannumeraria e di un microtubulo periferico aggiuntivo; **b**, assenza di un microtubulo periferico e assenza pressoché totale dei bracci di dineina; **c**, assenza della coppia microtubulare centrale con assenza parziale dei bracci di dineina; **d**, assenza della coppia centrale e di una coppia periferica con assenza parziale dei bracci di dineina. Per gentile concessione della Dott.ssa Angela Cangioti, Servizio di Microscopia Elettronica, Azienda Ospedaliera "Umberto I", Ancona.

al problema sono concordi nel ritenere che le IRR siano il risultato di due ordini di fattori: ambientali e costituzionali, anche se non c'è uniformità di vedute per quel che concerne il peso da dare a ciascuno dei due (24).

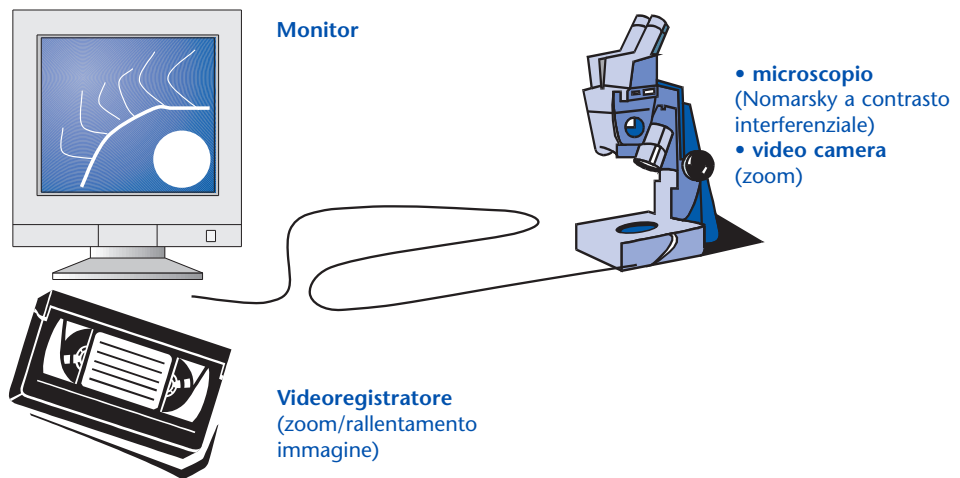
Numerose sono state le ricerche tese, in passato, ad identificare un eventuale difetto immunologico a sostegno delle IRR; negli ultimi dieci anni è andata invece aumentando l'attenzione verso l'apparato ciliare (25-28).

In una nostra passata esperienza (26) abbiamo cercato di verificare il ruolo dell'apparato ciliare in 27 bambini fra i 2 e i 6 anni affetti da IRR (più di 6 episodi/anno) all'inizio di un episodio respiratorio acuto ad eziologia virale (confermata sierologicamente), dopo tre settimane e successivamente dopo un periodo di convalescenza di almeno 12 settimane, periodo ampiamente più lungo di quello

ritenuto necessario al ripristino dell'architettura ciliare (29). Lo studio morfologico è stato effettuato presso l'Istituto di Morfologia Umana Normale dell'Università di Ancona, su materiale prelevato dal turbinato inferiore e dal setto di ambedue le narici, secondo l'ormai consueta metodica di Rutland e Cole (30).

I nostri risultati mostravano in 7 pazienti la persistenza di alterazioni ciliari in una percentuale piuttosto elevata di assonemi (32%) dopo oltre 12 settimane dall'insulto infettivo, in pieno benessere clinico.

Più precisamente, accanto ad alterazioni del *pattern* microtubulare centrale e periferico si rilevavano difetti (assenza o accorciamento) dei bracci di dineina ed assenza dei ponti radiali in un numero non trascurabile di assonemi. Tali alterazioni, spesso associate tra di loro (figura 1), risultavano



Obiettivo	100x
+ Cinepresa	6x
+ Video-zoom	4 - 9x
inquadratura finale fino a	2400x - 5400x
Lunghezza finale ciglia sul monitor	>3cm

Figura 2 Osservazione movimento ciliare in contrasto interferenziale [31].

inquadabili, per la loro tipologia e per la loro persistenza, tra le congenite. Si discostavano da queste ultime per la percentuale di ciglia esaminate che, per quanto molto elevata (32%) rispetto a quanto si può osservare nei soggetti normali (5-10%), non superava il 50%, limite abituale per arrivare a definirle congenite (1, 2).

I nostri morfologi hanno definito queste lesioni "borderline", e noi stessi abbiamo utilizzato tale definizione quando abbiamo effettuato, contemporaneamente allo studio morfologico, lo studio del battito ciliare in questi bambini. Tale studio, eseguito con microscopio a contrasto interferenziale (Nomarsky) complementato da telecamera JVC e tecnica video-zoom, secondo metodica da noi stessi descritta (31) (figura 2), ci consentiva di rilevare una frequenza al limite della norma (circa 10 hz) ad oltre 12 settimane dall'insulto infettivo.

Più che la frequenza borderline, ci colpiva la presenza di un movimento poco efficace, scarsamente coordinato, caratterizzato da perdita del tipico ritmo metacronale in più campioni esaminati (figura 3a, 3b).

In merito a questi particolari bambini, definibili a tutt'oggi IRR senza una precisa definizione diagnostica, si possono fare alcune considerazioni.

Potrebbe trattarsi di pazienti con lesioni ciliari acquisite, nei quali la persistenza e particolare intensità delle alterazioni potrebbero essere legate ad un'amplificazione del danno virale da parte dei mediatori, delle sostanze e delle cellule coinvolti negli eventi flogistici.

Tuttavia occorre considerare che, per quanto lungo, il processo di ripristino dell'apparato ciliare dopo un insulto infettivo-flogistico si esaurisce nel giro di 5-8 settimane (29). Per di più i 7 pazienti da noi presi in considerazione non differivano dagli altri 20 né per l'età, né per l'eziologia infettiva (virale in tutti i casi), ma solamente per l'andamento clinico piuttosto intenso dell'episodio e per la particolare tendenza alle recidive con medesime caratteristiche nel successivo periodo di *follow-up*. È verosimile che in questi pazienti si possa essere verificata un'interferenza del genoma virale con il metabolismo della cellula ciliata così come descritto in precedenza da Carson (14).

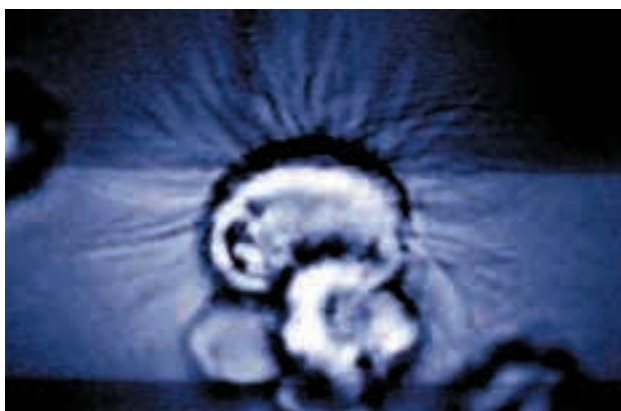


Figura 3a Particolare su monitor della figura 2: movimento ciliare non coordinato, non efficace, tipico della DCP.

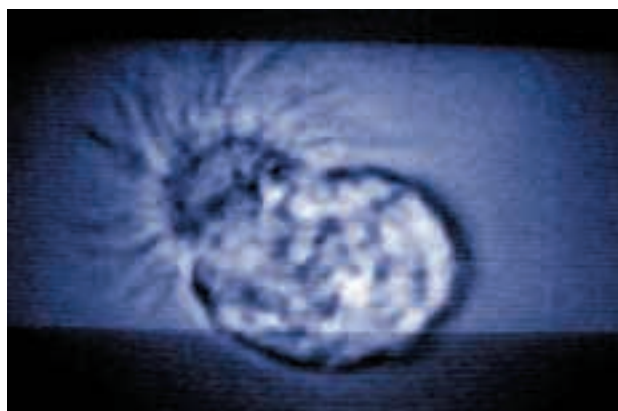


Figura 3b Particolare su monitor della figura 2: movimento ciliare corretto e coordinato in soggetto normale.

È suggestivo ipotizzare che l'alterata ciliogenesi indotta dai ripetuti insulti virali possa portare ad un progressivo decremento dell'attività difensiva mucociliare, con conseguente ulteriore intensificazione della frequenza e gravità delle infezioni, venendosi così a creare un circolo vizioso, come riportato in *figura 4*.

Sarebbe tuttavia superficiale escludere a priori che le ciglia di questi particolari pazienti possano essere non solamente vittima, ma anche causa, o per lo meno concausa, degli insulti infettivi. Potrebbe infatti trattarsi di soggetti particolarmente labili sotto il profilo del ripristino ciliare, o portatori di

difetti ciliari minori, di cui Afzelius ha prospettato l'esistenza, definendoli talora soggetti a "ciliogenesi imperfecta" (1).

È una ipotesi affascinante, ma che dovrebbe essere ampiamente verificata con ulteriori studi, caratterizzati da un *follow-up* clinico e morfologico piuttosto prolungato.

Gli studi effettuati a tutt'oggi sul rapporto tra IRR ed apparato ciliare sono infatti ancora troppo pochi per poter trarre delle conclusioni certe su queste argomento. In definitiva si avverte, a nostro avviso, l'esigenza di approfondire con ulteriori ricerche le conoscenze in questo settore.

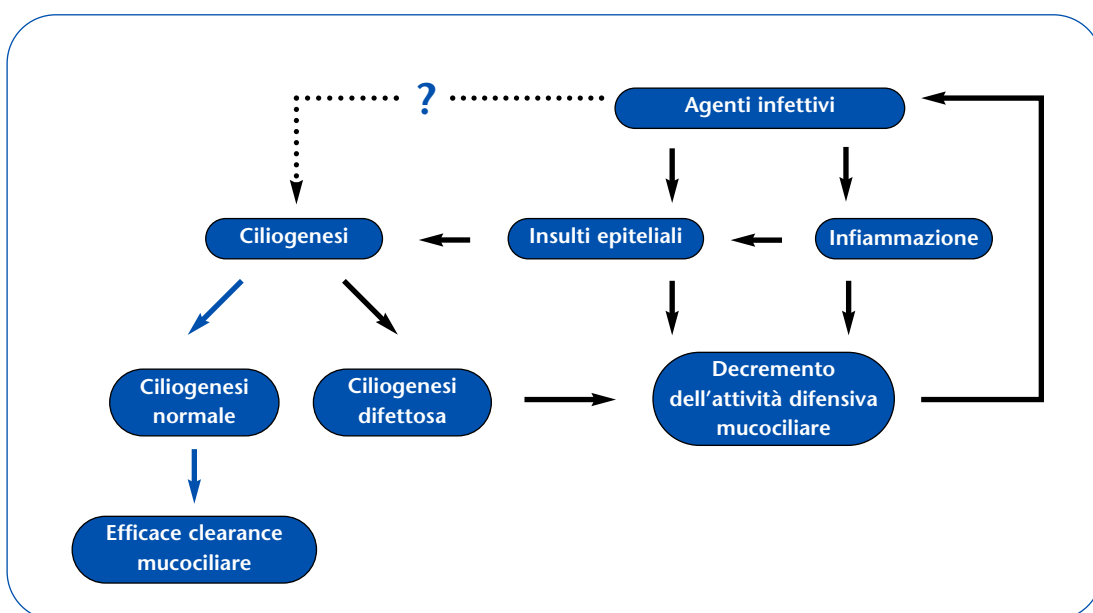


Figura 4 Rappresentazione schematica dei presumibili rapporti tra infezioni, ciliogenesi e clearance muco-ciliare nei bambini IRR con alterazioni ciliari borderline: spiegazione nel testo.

IRR ed apparato ciliare: le prospettive future

Negli ultimi anni è stata suggerita, per la diagnosi di DCP, la coltura *in vitro* di cellule epiteliali ciliate prelevate dal turbinato medio con metodica *brushing*. Ciò permetterebbe la rigenerazione delle ciglia in ambiente "protetto" consentendo un successivo giudizio morfologico più attendibile, in quanto effettuato su ciglia non esposte a *noxae* patogene (32).

Per quanto molto promettente, questa tecnica è ancora in fase di ricerca sperimentale e dunque lontana da un'applicazione diagnostica routinaria (6, 32). Per di più è comunque imprescindibile da biopsia o *brushing*, dunque sempre alquanto invasiva.

Per quanto attiene gli studi di genetica molecolare, se da un lato vi è concordanza nel ritenere la DCP una malattia autosomica recessiva (6, 33), dall'altro la complessa eterogeneità genetica di questa malattia non permette a tutt'oggi di trarre conclusioni definitive in merito e tanto meno di disporre di elementi utili alla consulenza genetica (33-37).

Recentemente è stata prospettata la valutazione dell'Esalazione di Ossido Nitrico (ENO) quale test diagnostico per la DCP.

L'utilizzo di tale metodica si basa sull'acquisizione che i livelli di NO riscontrabili nei soggetti affetti da DCP sono estremamente bassi, soprattutto quando la misurazione è stata effettuata su esalato nasale (38, 39).

D'altra parte, tra le molteplici ipotetiche funzioni dell'NO quale molecola di segnale è stata descritta anche quella di una modulazione del battito ciliare (6, 38, 40).

Livelli altrettanto ridotti, anche se non così bassi come nella DCP, si riscontrano anche nella fibrosi cistica (38) e nelle sinusiti infettive non allergiche (41), dove la scarsa rilevazione di NO sembra dovuta essenzialmente al mancato trasporto della molecola per un'ostruzione degli osti sinusali. Nella DCP invece si ipotizza, sulla base di alcuni studi, che ci sia proprio una mancata produzione di NO soprattutto nei seni paranasali che, come noto, costituiscono la principale sede di formazione di questa molecola (38, 42).

Questa ipotesi ben si accorda con il riscontro di una produzione di NO (ad opera della NO-sintetasi) localizzata nel corpuscolo basale dell'epitelio ciliato (4, 43, 44).

Sulla base di queste conoscenze si è pertanto ipotizzato che nella DCP la difettosa ciliogenesi sia associata ad un altrettanto difettosa formazione di NO (4).

Per quanto i rapporti tra NO e DCP non siano ancora del tutto chiari (45), le suddette acquisizioni permettono di prospettare a breve termine un utilizzo dell'ENO nasale almeno come test di *screening* nel sospetto diagnostico di DCP (46).

Per il fatto di essere, almeno concettualmente, di facile applicazione e soprattutto certamente non cruento, tale test potrebbe risultare utile, unitamente ad altri parametri clinici e strumentali, nel selezionare i pazienti IRR da sottoporre a biopsia o *brushing* della mucosa respiratoria, tecniche caratterizzate invece da una certa cruenza.

Per quanto promettente ed entusiasmante, la valutazione di ENO nasale comporta tuttavia ancora delle difficoltà applicative tecniche che, anche per nostra diretta esperienza, non è facile superare nel bambino non collaborante (39), soprattutto qualora si vogliano osservare scrupolosamente le Linee Guida in merito, sia ERS (47), che soprattutto ATS (48). In ambedue i casi, la campionatura di NO dal naso richiede una manovra di pausa respiratoria prolungata dopo inspirazione massimale, finalizzata a chiudere il palato molle; questo al fine di non contaminare l'aria proveniente dai seni paranasali con NO derivante dalle basse vie aeree. È intuibile che una manovra del genere, così come l'utilizzo di resistenze orali (*figura 5*), richiede comunque sempre un certo grado di collaborazione (39). In una nostra recente esperienza (49) abbiamo potuto verificare tali difficoltà applicative in 6 pazienti con diagnosi certa di DCP. La determinazione media di ENO (5 ± 2 PPB) tende a confermare come la concentrazione di NO nasale in questi pazienti sia molto bassa. È tuttavia doveroso far notare come per ottenere un *plateau* di NO attendibile siamo dovuti ricorrere all'utilizzo di una metodica derivata dalle Linee Guida ERS (47) ulteriormente semplificata, così come descritto da altri Autori (38, 39, 42).

È inoltre importante sottolineare come l'età media di questi pazienti sia piuttosto elevata (anni 10 ± 5), il che ci ha consentito una valida collaborazione.

Sono sostanzialmente queste difficoltà, che verosimilmente si supereranno a breve termine, a costituire allo stato attuale un discreto ostacolo all'utilizzo routinario di ENO nasale quale test di *screening*, in quanto la limitazione legata all'età si

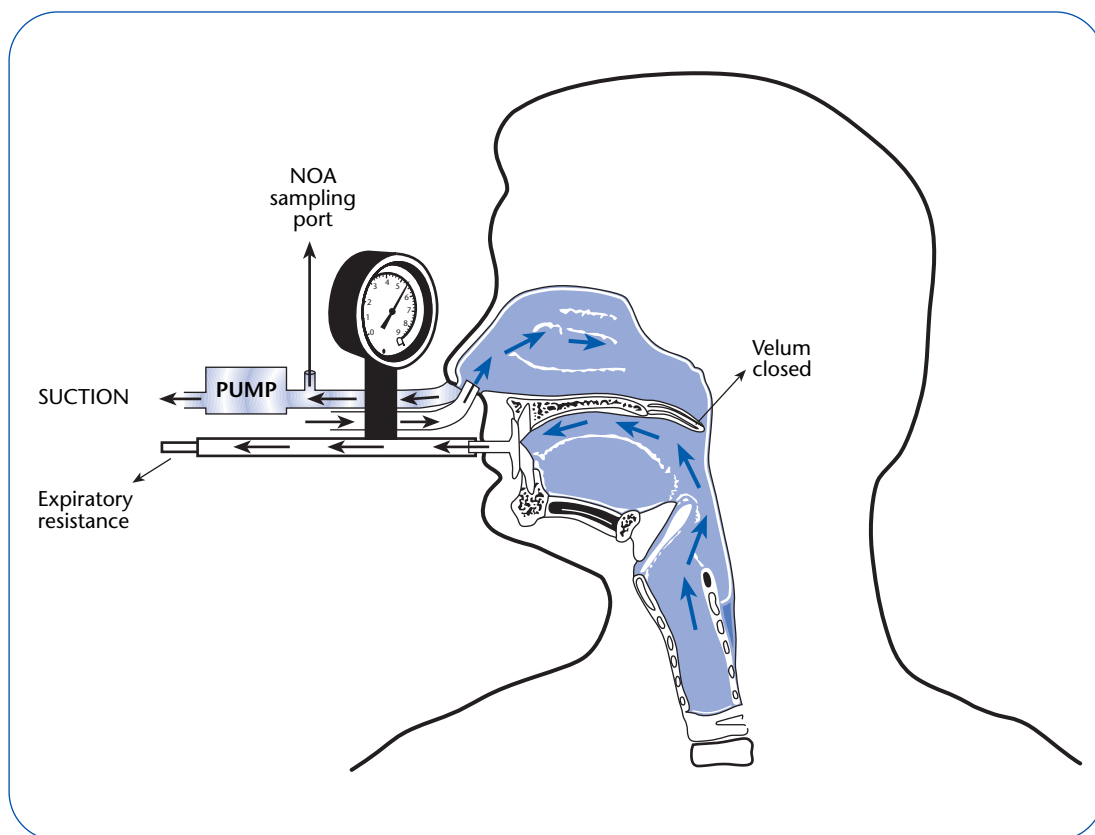


Figura 5 Apparecchiatura necessaria alla valutazione di ENO nasale secondo le Linee Guida ATS [48].

scontra con l'esigenza di una diagnosi precoce della DCP, essenziale invece per prevenire le bronchiectasie (39).

IRR e patologia ciliare: iter diagnostico e identikit clinico

Allo stato attuale delle conoscenze vi è un generico assenso in letteratura nel ritenere che la diagnosi di certezza di DCP debba scaturire, avendo ovviamente cura di escludere altre patologie potenzialmente fuorvianti (fibrosi cistica, asma, RGE, deficit immunitari, deficit di α_1 -antitripsina), da un adeguato esame morfostrutturale, che resta l'esame direttamente (3, 6), purché effettuato in centri idonei.

Altrettanto assenso vige nel dare ampio spazio allo studio del battito ciliare *in vitro*, esame che, unitamente agli elementi clinici, costituisce un valido complemento al lavoro del morfologo, nel suo non facile compito di giudizio finale (6, 33, 50-53). Lo studio del battito ciliare assume molta importanza quando si considera che è stata descritta una discreta correlazione tra tipo di lesione e

difetto di motilità (5). Il suo ruolo è altrettanto importante alla luce della descrizione di casi di difetto di movimento con struttura normale (54). Anche lo studio del battito ciliare deve essere effettuato in sedi di comprovata esperienza e dotate di idonea attrezzatura.

Laddove lo permette l'età possono essere utilizzati come primo esame i test di trasporto mucociliare (6), mentre la valutazione di ENO si prospetta molto utile almeno quale test di *screening* iniziale.

Se vi è oggi un discreto assenso per quel che concerne l'iter diagnostico, molto più numerose restano invece in letteratura le controversie legate all'indice di sospetto clinico ed alla non univoca interpretazione delle alterazioni ciliari inquadabili come borderline.

Ben si comprende come il corteo sintomatologico che consegue ad un danno ciliare congenito con piena espressione fenotipica sia piuttosto ricco, tale da evocare facilmente il sospetto diagnostico nel pediatra (*tabella 1*).

Il problema maggiore sorge invece di fronte ai casi ad estrinsecazione fenotipica minore, che si possono manifestare con sintomi clinici più lievi e quindi tali da non indurre, almeno in prima battuta, un sospetto di DCP.

Gli studi inerenti il ruolo delle ciglia nelle IRR non sono molti a tutt'oggi, ma dalle loro conclusioni emerge quale comune denominatore la possibilità che il pediatra, nella gestione del bambino IRR, si possa trovare di fronte ad anomalie ciliari più spesso di quanto atteso (14, 25-28). È stato infatti di recente segnalato come alterazioni ciliari congenite siano state riscontrate in oltre il 5% dei bambini con IRR (28).

D'altronde ciò non stupisce se si considera che, come espresso precedentemente da Afzelius (1) e recentemente da altri Autori (6), almeno 200 proteine sono coinvolte nella struttura di ogni singolo ciglio, ognuna codificata da un gene diverso, e che molti altri geni sono probabilmente coinvolti nel corretto assemblaggio e nella regolazione dell'attività ciliare. Di fronte ad una siffatta complessità genetica non ci si deve dunque meravigliare di

potersi talvolta trovare di fronte ad un'estrinsecazione fenotipica caratterizzata da difetti ciliari minori e dunque da un quadro clinico di IRR potenzialmente fuorviante.

In altre parole l'*identikit clinico* del paziente da sottoporre allo studio dell'apparato ciliare, potrebbe talora discostarsi da quello tradizionalmente ritenuto evocativo di DCP, caratterizzato da sintomatologia respiratoria intensa e precoce, per presentarsi invece con dei quadri clinici più *contenuti* e proprio per questo ingannevoli.

In definitiva la patologia ciliare, certamente non così frequente come altre cause di morbidità respiratoria, potrebbe essere meno rara di quanto classicamente ritenuto. Questo soprattutto in considerazione del non trascurabile numero di bambini IRR che restano senza un preciso inquadramento diagnostico ed alla luce delle considerazioni di alcuni Autori (1, 6, 27, 55) che sono pienamente d'accordo nel ritenere che la prevalenza della patologia ciliare congenita potrebbe essere alquanto più alta se venissero riconosciute anche le forme ad espressione fenotipica minore.

Tabella 1 Elementi clinico-anamnestici "tradizionalmente" evocativi di DCP. Oggi si ammette l'esistenza di IRR caratterizzate talora da quadri clinici respiratori meno intensi di quelli tradizionalmente descritti, dunque potenzialmente fuorvianti, quale verosimile espressione di forme di DCP ad estrinsecazione fenotipica minore (1, 6, 27, 28).

distress respiratorio neonatale

rinorrea e tosse persistente sin dalle prime epoche della vita

IRR a esordio precoce, con frequenza e intensità superiore a quelle attese, in assenza di fattori ambientali evidenziabili

otiti, sinusiti e bronchiti ricorrenti ad eziologia batterica importante (Haemophilus, Pseudomonas, Staphylococcus)

broncoostruzione clinica e spirometrica resistente al trattamento abituale

bronchiectasie e atelettasie

idrocefalo non ostruttivo

uno o più elementi riscontrabili nella Sindrome di Kartagener

familiarità per DCP o per Sindrome di Kartagener

Sindrome di Young

retinite pigmentosa

Sindrome di Usher*

*Retinite pigmentose e sordità congenita, talora associata a DCP

Bibliografia

1. Afzelius BA. *Disorders of ciliary motility*. Hosp Pract 1986; 21 (3): 73.
2. Rossmann CM, Newhouse MT. *Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management*. Pediatr Pulmonol 1988; 5: 36.
3. Bush A, Cole P, Hariri M, et al. *Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care*. Eur Respir J 1998 Oct; 12 (4): 982-988.
4. Afzelius BA. *Immotile cilia syndrome: past, present, and prospect for the future*. Thorax 1998; 53: 894-897.
5. Schidlow DV. *Primary ciliary dyskinesia (the immotile cilia syndrome)*. Ann Allergy 1994; 73 (6): 457-468.
6. Meeks M, Bush A. *Primary Ciliary Dyskinesia (PCD)*. Pediatr Pulmonol 2000; 29: 307-316.
7. Canciani M, Barlocco EG, Cazzola GA, et al. *The association of supernumerary microtubules and immotile cilia syndrome and defective neutrophil chemotaxis*. Acta Paediatr Scand 1988; 77: 606-607.
8. Kantar A, Oggiano N, Giorgi PL, Fiorini RM. *Membrane fluidity of polymorphonuclear leukocytes from children with primary ciliary dyskinesia*. Pediatr Res 1993; 34: 725-728.
9. Paolucci F, Cinti S, Cangiotti A, et al. *Steatosis associated with immotile cilia syndrome: an unrecognized relationship?* Journal of Hepatology 1992; 14: 317-324.
10. De Santi MM, Magni A, Valletta EA, et al. *Hydrocephalus, bronchiectasis and ciliary aplasia*. Arch Dis Child 1990; 65: 543-544.
11. Oggiano N, Kantar A, Fabbri E, et al. *Respiratory distress in a newborn with primary ciliary dyskinesia, Situs Inversus and Turner Syndrome*. Minerva Pediatr 1994; 46: 153-155.
12. Arzumetova DS, Malikova ZM. *Atypical case of Shereshevskii-Turner syndrome associated with Kartagener syndrome*. Probl Endokrinol Mosk 1984; 30: 31-32.
13. Carson JL, Collier AM. *Ciliary defects: Cell biology and clinical perspectives*. Adv Pediatr 1988; 35: 139-166.
14. Carson JL, Collier AM, Hu S-CS. *Acquired ciliary defects in nasal epithelium of children with acute viral upper respiratory infections*. N Engl J Med 1985; 312: 463-468.
15. Hingley ST, Hastie AT, Kueppers F, Higgins ML. *Disruption of respiratory cilia by proteases including those of Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 1986; 54: 379-385.
16. Pedersen M. *Ciliary Activity and Pollution*. Lung 1990; Supp: 368-376.
17. Sykes DA, Wilson R, Greenstone R, et al. *Deleterious effect of purulent sputum sol on human ciliary function in vitro: at least two factors identified*. Thorax 1987; 42: 256-261.
18. Hastie AT, Leogering DA, Gleich GJ, Kueppers F. *The effect of purified human eosinophil major basic protein on mammalian ciliary activity*. Am Rev Respir Dis 1987; 135: 848-853.
19. Smallman LA, Hill SL, Stockley RA. *Reduction of ciliary beat frequency in vitro by sputum from patients with bronchiectasis: serine proteinase effect*. Thorax 1984; 39: 663-667.
20. Nieminen MM, Moilanen EK, Nyholm J-EJ, et al. *Platelet activating factor impairs mucociliary transport and increases plasma leukotriene B4 in man*. Eur Respir J 1991; 4: 551-560.
21. Kantar A, Oggiano N, Giorgi PL, et al. *Polymorphonuclear leukocytes-generated oxygen metabolites decrease beat frequency of human respiratory cilia*. Lung 1994; 172: 215-222.
22. Canciani M, Barlocco EG, Mastella G, et al. *The saccharin method for testing mucociliary function in patients suspected of having primary ciliary dyskinesia*. Pediatr Pulmonol 1988; 5: 210-214.
23. Afzelius BA, Gargani G, Romano C. *Abnormal length of cilia as a possible cause of defective mucociliary clearance*. Eur J Respir Dis 1985; 66: 173-180.
24. Consensus Conference: Gruppo di Immunologia della Società Italiana di Pediatria. *Le infezioni ricorrenti: definizione e approccio diagnostico*. Medico e Bambino 1989; 2: 26.
25. Barlocco EG, Valletta EA, Canciani M, et al. *Ultrastructural ciliary defects in children with recurrent infections of the lower respiratory tract*. Pediatr Pulmonol 1991; 10: 11-17.

- 26.** Giorgi PL, Oggiano N, Braga PC, et al. *Cilia in children with recurrent upper respiratory tract infection: ultrastructural observation.* *Pediatr Pulmonol* 1992; 14: 201.
- 27.** Wanner A, Salathè M, O'Riordan GT. *Mucociliary clearance in the airways.* *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1868-1902.
- 28.** Chapelin C, Coste A, Reinert P, et al. *Incidence of primary ciliary dyskinesia in children with recurrent respiratory diseases.* *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 854-858.
- 29.** Carson JL, Collier AM, Knowles MR, et al. *Morphometric aspects of ciliary distribution and ciliogenesis in human nasal epithelium.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6996-6999.
- 30.** Rutland J, Cole PJ. *Non-invasive sampling of nasal cilia for measurement of beat frequency and study of ultrastructure.* *Lancet* 1980; ii: 564-565.
- 31.** Giorgi PL, Oggiano N, Kantar A, et al. *Analysis of respiratory cilia motion and beat frequency counting in screening for primary ciliary dyskinesia in pediatric age.* *Riv Ital Pediatr* 1991; 17: 707-711.
- 32.** Jorissen M, Bertrand B. *Ciliary dyskinesia in the nose and paranasal sinuses.* *Acta Otolaryngol Belge* 1997; 51: 353-366.
- 33.** Leigh MW. *Primary ciliary dyskinesia.* In: Chernick V, Boat TF. "Kendig's disorders of the respiratory tract in children". Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Co., 6th ed., 1998: 819-825.
- 34.** Bianchi E, Savasta S, Caligaro A, et al. *HLA haplotype segregation and ultrastructural study in familial immotile cilia syndrome.* *Hum Genet* 1992; 89: 270-274.
- 35.** Pan Y, McCaskill CD, Thompson K, et al. *Paternal isodisomy of chromosome 7 associated with complete situs inversus and immotile cilia.* *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1551-1555.
- 36.** Witt M, Wang Y-F, Wang S, et al. *Exclusion of chromosome 7 for Kartagener syndrome but suggestion of linkage in families with other form of primary ciliary dyskinesia.* *Am J Hum Genet* 1998; 64: 313-318.
- 37.** Gasparini P, Grifa A, Oggiano N, et al. *Immotile cilia syndrome: a recombinant family at HLA-linked gene locus.* *American Journal of Medical Genetics* 1994; 49: 450-451.
- 38.** Lundberg JON, Weitzberg E, Nordvall SL, et al. *Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome.* *Eur Respir J* 1994; 7: 1501-1504.
- 39.** Karadag B, James AJ, Gultekin E, et al. *Nasal and lower airway level of nitric oxide in children with primary ciliary dyskinesia.* *Eur Respir J* 1999; 13: 1402-1406.
- 40.** Jain B, Rubenstein I, Robbins RA, et al. *Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide.* *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 83-88.
- 41.** Baraldi E, Azzolin NM, Biban P, Zacchello F. *Effect of antibiotic therapy on nasal nitric oxide concentration in children with acute sinusitis.* *Am J Crit Care Med* 1997; 155: 1680-1683.
- 42.** Grasmann H, Gartig SS, Wiesemann HG, et al. *Effect of L-arginine infusion on airway NO in cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia syndrome.* *Eur Respir J* 1999; 13: 114-118.
- 43.** Kobzik L, Bredt DS, Lovenstein CJ, et al. *Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization.* *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 371-377.
- 44.** Xue C, Botkin SJ, John RA. *Localization of endothelial NOS at the basal microtubule membrane in ciliated epithelium of rat lung.* *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 463-471.
- 45.** Loukides S, Kharitonov S, Wodehouse T, et al. *Effect of arginine on mucociliary function in primary ciliary dyskinesia.* *Lancet* 1998; 352: 371-372.
- 46.** Baraldi E, Azzolin N, Carrà S, Zacchello F. *Application of exhaled nitric oxide measurement in paediatrics.* *Eur Respir Rev* 1999; 9: 68, 234-240.
- 47.** Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. *Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations.* *Eur Respir J* 1997; 10: 1683-1693.

- 48.** American Thoracic Society. *Recommendation for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adult and children-1999.* Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 2104-2117.
- 49.** Oggiano N, Martiri G, Boselli L, et al. *Ossido nitrico esalato nasale e diagnosi di discinesia ciliare primitiva.* Comunicazione al V Congresso Nazionale SIMRI, Sorrento 12-15 settembre 2001.
- 50.** Holzmann D, Ou PM, Felix H. *Diagnostic approach to primary ciliary dyskinesia: a review.* Eur J Pediatr 2000; 159: 95-98.
- 51.** Riechelmann H, Hafner B, Maurer J, Mann W. *Diagnostic procedure in primary ciliary dyskinesia.* Laryngorhinotologie 1999; 78 (4): 194-199.
- 52.** Santamaria F, De Santi MM, Grillo G, et al. *Ciliary motility at light microscopy: a screening technique for ciliary defects.* Acta Paediatr 1999; 88 (8): 853-857.
- 53.** Oggiano N, Kantar A, Coppa GV. *Patologia ciliare.* In: Giorgi PL. "Argomenti di malattie respiratorie infantili" a cura della SIMRI, Pisa: Pacini ed., 1998; 231-244.
- 54.** Greenstone MA, Dewar A, Cole PJ. *Cilia dyskinesia with normal ultrastructure.* Thorax 1983; 38: 875.
- 55.** Sturgess JM, Turner JAP. *The immotile cilia syndrome.* In: Chernick V, Kendings EL, eds. *Disorders of the respiratory tract in children.* Philadelphia: WB Saunders Co. Fifth edition 1990, p. 657.

Si ringrazia per la disponibilità e la preziosa collaborazione
la Dott.ssa Angela Cangiotti,
Servizio di Microscopia Elettronica
Azienda Ospedaliera "Umberto I", Ancona

Poster



Analisi retrospettiva su 67 pazienti sottoposti a fibrobroncoscopia per sospetta inalazione di corpo estraneo afferenti a 4 Centri di Pneumologia Pediatrica del Gruppo di Studio di Endoscopia della Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili (SIMRI)

R. Guidi¹, A. Barbato², S. Cingolani¹, N. Forenza⁴, A. Grzejdzia¹, F. Midulla¹, M. Pifferi³, S. Quattrucci¹, E. Soldi¹, G. Tancredi¹

¹Clinica Pediatrica Università "La Sapienza" di Roma; ²Clinica Pediatrica Università di Padova; ³Clinica Pediatrica Università di Pisa; ⁴Clinica Pediatrica Università di Perugia

Obiettivi. Analizzare l'esperienza di 4 centri di Pneumologia Pediatrica afferenti al Gruppo di Studio di Endoscopia della SIMRI sui bambini con anamnesi positiva per inalazione di corpo estraneo giunti all'osservazione nel periodo 1990-2000.

Pazienti e metodi. Sono state retrospettivamente analizzate le cartelle cliniche di 67 pazienti (40 maschi, 59,7%; range di età: 9 mesi-13,5 anni, età media 26±21 mesi) considerando la storia clinica, l'esame obiettivo e le procedure diagnostiche.

Risultati. In 57 (85%) pazienti (38 maschi) è stato rilevato un corpo estraneo nelle vie aeree mediante fibrobroncoscopia. La triade sintomatologica tipica per inalazione (tosse, sibili localizzati e murmure vescicolare ridotto) era presente solo nel 16% dei casi (sensibilità=19%; specificità=100%). I 57 bambini che avevano inalato un corpo estraneo avevano una età media di 24 mesi (range: 11-75 mesi) e il 91% di essi aveva una età inferiore o uguale a 3 anni. Solo nel 30% dei casi la diagnosi di inalazione è stata posta nelle 24 ore successive

all'evento e nel 21% dei casi a distanza di più di 2 settimane. Il bronco principale di destra era la localizzazione più frequente del corpo estraneo nell'albero tracheobronchiale (49%) e quello più comunemente rilevato era di tipo vegetale (78%).

La radiografia del torace ha evidenziato un *air trapping* localizzato nel 36% dei casi, mentre mostrava un quadro di assoluta normalità nel 19% dei casi.

Conclusioni. Considerata la scarsa sensibilità e specificità dei dati clinici e delle immagini radiografiche, il nostro studio ha evidenziato la necessità di procedere prima possibile ad un esame endoscopico delle vie aeree nel momento in cui si pone il sospetto di avvenuta inalazione di un corpo estraneo.



L'attività inibitoria del fluticasone propionato (FP) sulle funzioni delle cellule epiteliali bronchiali umane (CEB) *in vitro* è correlata al loro livello di attivazione (FLIC24)

F. Sabatini¹, M. Silvestri¹, R. Sale¹, P. Di Blasi², G.A. Rossi¹

¹U.O. Pneumologia, Istituto G. Gaslini, Genova, e ²GlaxoSmithKline S.p.a., Verona

Per valutare se l'attività inibitoria del FP sulle CEB sia correlata all'intensità dell'espressione delle molecole di adesione (MA) o alla quantità di citochine (cyt) rilasciate, CEB sono state stimulate per 24 h con IL-4+TNF- α (20ng/ml) in presenza o meno di FP (1.0, 10 e 100 nM). Al termine dell'incubazione è stata valutata l'espressione di ICAM-1 e di VCAM-1 sulle CEB (analisi citofluorimetrica) ed il rilascio di IL-8, GM-CSF o RANTES nei sovrantanti di coltura (analisi citofluorimetrica o ELISA). È stato osservato che CEB esprimevano costitutivamente più ICAM-1 che VCAM-1 (13.9 ± 6.4 mfc, 3.6 ± 0.8 mfc; $p < 0.05$) e rilasciavano più IL-8 che GM-CSF o RANTES ($7,504.3 \pm 1,646.3$ pg/ml, 2.1 ± 1.6 pg/ml; $p < 0.05$ per ogni confronto). L'esposizione delle CEB a IL-4+TNF- α stimolava maggiormente l'espressione di ICAM-1 rispetto a VCAM-1 ($188.3 \pm 39.0\%$ vs $82.3 \pm 25.4\%$ d'incremento; $p < 0.05$) ed induceva un più elevato rilascio di RANTES che di GM-CSF o IL-8 (557.0 ± 202.1 vs 65.96 ± 19.3 e $97.3 \pm 18.3\%$ d'incremento; $p < 0.05$, per ogni confronto). A tutte le concentrazioni testate, FP era più efficace nel ridurre l'espressione di

ICAM-1 che di VCAM-1 ($p < 0.05$, per ogni confronto) ed il grado di inibizione correlava positivamente con l'aumento dell'espressione delle MA indotto dalle due cyt ($p < 0.05$, per ogni correlazione). Analogamente FP, alle due concentrazioni più elevate, inibiva più efficacemente il rilascio di RANTES rispetto a GM-CSF e il-8 ($p < 0.05$, per ogni confronto), ed il grado di inibizione correlava positivamente con le quantità di cyt rilasciate dalle CEB attivate ($p < 0.05$, per ciascuna correlazione). Pertanto, le CEB, a riposo o stimulate, esprimono differenti livelli di MA e rilasciano diverse quantità di cyt e l'inibizione del FP sembra essere direttamente correlata all'intensità delle attività biologica basale o della risposta delle CEB agli stimoli.



Congressi

Congresses

SETTEMBRE 2002

The Seventh SIDS International Conference

Firenze (FI)
31.08.2002 – 04.09.2002
Segreteria scientifica:
Ospedale Pediatrico A Meyer
Tel. 055.5662587
E-mail centrosids@meyer.it
Segreteria organizzativa:
M.C.A. Events srl
Tel. 02.34934404
Fax 02.34934397

12th ERS Annual Congress

Stoccolma (Svezia) 14 - 18 settembre 2002
Segreteria scientifica:
Kjell Larsson; Dept. of Occupational Health -
National Inst. for Working Life - Solna
Tel. +46 8 730 91 74
Fax +46 8 730 98 97
E-mail klarsson@niwl.se
Claes-Göran Löfdahl; Dept. of Lung Medicine -
University Hospital of Lund - Lund
Tel. +46 46 17 12 06
Fax +46 46 14 67 93
E-mail claes-goran.lofdahl@lung.lu.se
William MacNee; Dept. of Medical and
Radiological Sciences ELEGI Colt Research
Laboratories Wilkie Building, Medical School,
Teviot Place - UK Edinburgh
Tel. +44 131 651 1435
Fax +44 131 651 1558
E-mail w.macnee@ed.ac.uk
Segreteria organizzativa:
Congrex Sweden AB

c/o ERS 2002 - P.O. Box 5619
SE-114 86, Stoccolma (Svezia)
Tel. +46 8 459 66 00
Fax +46 8 661 91 25
E-mail ers2002@congrex.se
<http://www.ersnet.org>

OTTOBRE 2002

VI Congresso Nazionale S.A.R.N. e P.I.

Firenze (FI) 3 - 5 ottobre 2002
Segreteria scientifica:
P Busoni, A Messeri; Ospedale "A. Meyer",
Firenze
E-mail p.busoni@meyer.it; a.messeri@meyer.it
Segreteria organizzativa:
Promo Leader Service Euro RSCG
Tel. 055.2462244
Fax 055.2342929
E-mail annalivia.arru@promoleader.com

7° Congresso Internazionale di Medicina d'Urgenza e Terapia Intensiva Pediatrica

Padova (PD) 18 - 20 ottobre 2002
Segreteria scientifica:
A Pettenazzo, L Da Dalt; Dipartimento di
Pediatria,
Università di Padova
Tel. 049.821 3505
Fax 049.821 3502
E-mail a.pettenazzo@pediatria.unipd.it
Segreteria organizzativa:
CSS
Tel. 055.2480202
Fax 055.2450246
E-mail css@css-congressi.it

**Congresso Nazionale di Pediatria
Ospedaliera G.S.P.O.**

Treviso (TV) 25 - 27 ottobre 2002

Segreteria scientifica:

G Temporin

Segreteria organizzativa:

MC

Tel. 348.3414612

NOVEMBRE 2002

**20° Simposio Internazionale di Terapia
Intensiva Neonatale**

Venezia (VE) 7 - 9 novembre 2002

Segreteria scientifica:

A Warm

Tel. 02.63633252

Fax 02.63745419

E-mail minoli@networld.it

Segreteria organizzativa:

M.C.A. Events Srl

Tel 02-34934404

Fax 02-34934397

**Paediatric Respiratory and Allergy
Meeting**

Valencia (Spagna) 21 - 23 novembre 2002

Segreteria organizzativa:

Viajes el corte ingles SA division de congresos

E-mail congreos.valencia@viajeseeci.es

MAGGIO 2003

ATS 2003

Seattle, Washington (USA) 16 - 21 maggio 2003

Electronic submission deadline: october 24, 2002

Paper submission deadline: october 17, 2002

<http://www.thoracic.org/ic/ic2003/call4input.asp>

GIUGNO 2003

**23rd International Congress of
Chemotherapy**

Durban (South Africa) 7 - 10 giugno 2003

Segreteria organizzativa:

23rd ICC Secretariat

Congrex Holland bv

AJ Ernststraat 595K

1082 LD, Amsterdam

The Netherlands

Tel. +31-20-50 40 200

Fax +31-20-50 40 225

E-mail icc2003@cingrex.nl

<http://www.congrex.nl/icc2003>

SETTEMBRE 2003

13th ERS Annual Congress

Vienna (Austria) 27 settembre - 1 ottobre 2003

Segreteria scientifica:

ERS Headquarters

1, boulevard de Grancy,

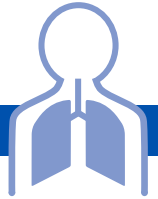
CH - 1006 Lausanne Switzerland

Tel. +41 21 613 02 02

Fax +41 21 617 28 65

E-mail info@ersnet.org

<http://www.ersnet.org>



Domanda di ammissione per nuovi Soci

Il sottoscritto, presa visione delle norme statutarie della Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili, che si impegna a rispettare e a far rispettare, chiede di essere ammesso quale socio ordinario.

DATI PERSONALI

Cognome e Nome _____

Luogo e data di nascita _____

Domicilio (via/piazza) _____

CAP _____

Città _____

Prov. _____

Regione _____

Sede di lavoro _____

Reparto _____

Indirizzo _____

Recapiti telefonici: Casa _____

Studio _____

Fax _____

Ospedale _____

Cellulare _____

e-mail _____

Laurea in Medicina e Chirurgia - Anno di laurea _____

Specializzazioni _____

Altri titoli _____

CATEGORIA

Universitario

Ospedaliero

Pediatra di libera scelta

QUALIFICA UNIVERSITARIA

Professore Ordinario

Professore Associato

Ricercatore

Altro _____

QUALIFICA OSPEDALIERA

Dirigente di 2° Livello

Dirigente di 1° Livello

Altro _____

Con la presente autorizzo la Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili a pubblicare i dati anagrafici sopra indicati nell'Annuario SIMRI

Data _____

Firma del Richiedente _____

Quota sociale: € 30,00. Pagamento da effettuarsi su c/c postale n. 45109006 intestato a Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili - Casella Postale 7039 - 00100 Roma Nomentano.
Causale versamento: quota SIMRI.

Compilare in stampatello e spedire allegando la copia del versamento a
Rag. Mario Ciocca - Casella Postale 7039 - 00100 Roma Nomentano.

**Per informazioni telefonare a: Rag. Mario Ciocca - Tel. 06.4403900 - Fax 06.44250889
e-mail fn41840@flashnet.it**



La Rivista pubblica contributi redatti in forma di editoriali, articoli d'aggiornamento, articoli originali, articoli originali brevi, 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 GENERALI

Testo: in lingua italiana o inglese, in triplice copia, dattiloscritto, con ampio margine, massimo 25 righe per pagina, con numerazione delle pagine a partire dalla prima, e corredato di:

- 1) titolo del lavoro in italiano, in inglese;
- 2) parola chiave in italiano, in inglese;
- 3) riassunto in italiano, in inglese;
- 4) titolo e didascalie delle tabelle e delle figure.

Si prega di allegare al manoscritto anche il testo memorizzato su dischetto di computer, purchè scritto con programma Microsoft Word versione 4 e succ. (per Dos e Apple Macintosh).

Nella **prima pagina** devono comparire: il *titolo* (conciso); i *nomi* degli Autori e *l'istituto o Ente* di appartenenza; la *rubrica* cui si intende destinare il lavoro (decisione che è comunque subordinata al giudizio del Direttore); il *nome, l'indirizzo* e *l'e-mail* dell'Autore cui sono destinate la corrispondenza e le bozze.

Nelle **ultime pagine** compariranno la bibliografia, le didascalie di tabelle e figure e l'eventuale menzione del Congresso al quale i dati dell'articolo siano stati comunicati (tutti o in parte).

Tabelle (3 copie): devono essere contenute nel numero (evitando di presentare lo stesso dato in più forme), dattiloscritte una per pagina e numerate progressivamente.

Figure (3 copie): vanno riprodotte in foto e numerate sul retro. I grafici ed i disegni possono essere in fotocopia, purchè di buona qualità.

Si accettano immagini su supporto digitale (floppy disc, zip, cd) purchè salvate in uno dei seguenti formati: **tif, jpg, eps** e con una risoluzione adeguata alla riproduzione in stampa (300 dpi); oppure immagini generate da applicazioni per grafica vettoriale (Macromedia Freehand, Adobe Illustrator per Macintosh). Sono riproducibili, benchè con bassa resa qualitativa, anche documenti generati da Power Point. Al contrario, **non sono utilizzabili in alcun modo** le immagini inserite in documenti Word o generate da Corel Draw.

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

Bibliografia: va limitata alle voci essenziali identificate nel testo con numeri arabi ed elencate al termine del manoscritto nell'ordine in cui sono state citate. Se gli autori sono fino a quattro si riportano tutti, se sono cinque o più si riportano solo i primi tre seguiti da "et al.". Esempi di corretta citazione bibliografica per:

articoli e riviste:

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

libri:

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

capitoli di libri o atti di Congressi:

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 grants o borse di studio, vanno citati al termine della bibliografia.

Le note, contraddistinte da asterischi o simboli equivalenti, compariranno nel testo a piè di pagina.

Termini matematici, formule, abbreviazioni, unità e misure devono conformarsi agli standards riportati in Scienze 1954; 120: 1078.

I farmaci vanno indicati col nome chimico. Solo se inevitabile potranno essere citati col nome commerciale (scrivendo in maiuscolo la lettera iniziale del prodotto).

Per la corrispondenza anagrafica e scientifica:

Prof. Angelo Barbato
Dipartimento di Pediatria
Università di Padova
Via Giustiniani, 3
35128 Padova
barbato@pediatria.unipd.it

INFORMAZIONI

Gli estratti sono addebitati agli Autori a prezzo di costo. Assegni e vaglia vanno inviati a:

"PNEUMOLOGIA PEDIATRICA"
Primula Multimedia S.r.l.
Via C. Angiolieri, 7
56010 Ghezzano - Pisa

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.

Le richieste di abbonamento e ogni altra corrispondenza relativa agli abbonamenti vanno indirizzate a:

Primula Multimedia S.r.l.
Via C. Angiolieri, 7
56010 Ghezzano - Pisa

PUBBLICITA'

SINGULAIR