



Ipertrofia adeno-tonsillare in pazienti pediatrici: utilità diagnostica di marcatori infiammatori

Amelia Mascolo, Giovanni Raimondo Pieri, Elena Chiodi, Vania Giunta,
Antonietta Marchi, Mara De Amici, Gian Luigi Marseglia

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Ipertrofia adeno-tonsillare in pazienti pediatrici: utilità diagnostica di marcatori infiammatori

La patologia adeno-tonsillare è una condizione clinica di frequente riscontro in età pediatrica, principalmente a causa della fisiologica ipertrofia che si verifica in questo periodo. Le adenoidi e le tonsille palatine, costituendo la prima linea di difesa nel tratto respiratorio superiore nei confronti dei microrganismi, assumono un ruolo chiave nei meccanismi di presentazione antigenica e nello sviluppo di una risposta infiammatoria locale agli stimoli infettivi. Pertanto, tali strutture risultano coinvolte in manifestazioni di tipo ostruttivo e infettivo, come otiti, rinosinusiti, faringiti, tonsilliti, sindromi disventilatorie e modificazioni muscolo scheletriche del viso, per le quali l'adenoidectomia e/o la tonsillectomia possono essere risolutive. Attualmente nessun marcatore infiammatorio viene utilizzato per la diagnosi di ipertrofia adeno-tonsillare, ma si ricorre esclusivamente alla valutazione endoscopica. Sono stati valutati diversi marcatori coinvolti in processi infiammatori (Triptasi, Mieloperossidasi, Proteina Cationica Eosinofila, M130-CD163, FcγRI-CD64), in 67 pazienti in età pediatrica affetti da ipertrofia adeno-tonsillare e sintomatici per tale condizione. I risultati hanno mostrato variazioni significative nei livelli di M130-CD163, FcγRI-CD64, MPO e ECP nel siero, dimostrando come tali marcatori possono risultare utili nella diagnosi e nell'individuazione di un momento adeguato per effettuare l'intervento chirurgico.

Adeno-tonsillar hypertrophy in pediatric patients: inflammation markers in diagnosis

Adeno-tonsillar disease is a common disorder in the pediatric population because of physiological hypertrophy during childhood. Adenoids and tonsils are the first defense mechanism against infections, therefore they have a key role in antigen presentation and local response to microorganisms. Adenoids and tonsils may be involved in obstructive and infective diseases, such as otitis, pharyngitis, tonsillitis, obstruction and facial block malformations; so adenoidectomy and/or tonsillectomy may be useful. Nowadays, inflammation markers are not used in adeno-tonsillar hypertrophy diagnosis, but only endoscopy is used. Tryptase, eosinophil cationic protein, myeloperoxidase, M130-CD163, FcγRI-CD64 were studied in 67 patients presenting adeno-tonsillar hypertrophy symptoms. Results were significant in M130-CD163, FcγRI-CD64, MPO e serum ECP levels; these markers may be useful in diagnosis of adeno-tonsillar hypertrophy and in the identification of the best moment to perform surgery.

Introduzione

La patologia adeno-tonsillare è una delle condizioni cliniche di più frequente riscontro in età pediatrica, principalmente a causa della fisiologica ipertrofia che si verifica in questo periodo della vita.

Le adenoidi (o tonsille tubariche) e le tonsille palatine rappresentano i due principali aggregati di tessuto linfoide associato alle mucose nel tratto respiratorio superiore, e costituiscono la prima linea di difesa nei confronti dei microrganismi. L'ipertrofia adeno-tonsillare è un processo fisiologico che si verifica durante l'infanzia, a causa dei meccanismi di stimolazione antigenica nei confronti dei linfociti dell'anello linfatico di Waldeyer, che durante questo periodo assumono un ruolo fondamentale nella difesa dell'organismo. Le alterazioni fisio-patologiche rispondono a due principali ordini di fenomeni: l'ipertrofia, con conseguente ostruzione anatomica, e l'infiammazione [1]. Poiché lo sviluppo degli spazi oro-faringei e delle strutture scheletriche di sostegno non procede con la stessa rapidità rispetto all'aumento di volume, le adenoidi ipertrofiche possono determinare una ostruzione meccanica alla tuba di Eustachio, con una conseguente disventilazione dell'orecchio medio e la concomitante propagazione dei processi infettivi dalla faringe. L'aumentato volume tonsillare, invece, può interferire con tutti i quei processi di tipo dinamico che coinvolgono il cavo orale e l'oro-faringe, come la deglutizione, la respirazione, l'armonica crescita dento-facciale e l'articolazione del linguaggio.

Oltre all'aumento para-fisiologico del volume adenoideo, un ulteriore possibile fattore causale per l'adenoidite è l'infiammazione su base allergica. Le adenoidi, a causa della presenza di mastociti, rappresentano una possibile sede di rilascio di mediatori infiammatori in corso di allergia, e quindi possono subire fenomeni di ipertrofia proprio a causa della presenza di cellule dell'immunità; questo è dimostrato dal fatto che in corso di adenoidite è possibile riscontrare la presenza di una elevata quantità di mast-cellule IgE positive, che rappresentano la principale fonte di rilascio di mediatori legati all'allergia [3]. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che, nei pazienti affetti da sindromi di tipo allergico (rinite allergica, asma e dermatite atopica), sulla superficie di adenoidi e tonsille è presente un biofilm di adesione di origine batterica, che permette la creazione di un micro-ambiente favorevole alle colonie di microrganismi e garantisce loro una particolare resistenza agli antibiotici, all'azione dei macrofagi, e alle variazioni di temperatura e pH. Si ritiene che tale caratteristica sia peculiare di questo gruppo di soggetti a causa della continua stimolazione infiammatoria esercitata soprattutto a livello della mucosa nasale, con il mantenimento di un circolo vizioso che perpetua sia la condizione di allergia (rinite allergica) che il processo ipertrofico a carico delle adenoidi [4].

Sul piano clinico, le conseguenze dei processi fisio-patologici precedentemente considerati sono rappresentate da diversi gruppi di sintomi e sindromi cliniche così riassumibili:

- *Otiti ricorrenti.* Il tessuto adenoideo può fungere da reservoir batterico, in quanto i microrganismi più frequentemente coinvolti in questo tipo di infezioni (*H. Influenzae*, *S. Aureus*, *M. Catharralis*), in questa sede possono organizzarsi in un biofilm, perpetuando processi infiammatori cronici o ricorrenti che possono poi diffondere all'orecchio medio attraverso la tuba di Eustachio, mal ventilata a causa dell'ostruzione su base ipertrofica/infiammatoria [3]. La conseguenza è rappresentata dall'otite media acuta: una flogosi purulenta dell'orecchio medio. La sintomatologia è tipicamente associata ai segni di flogosi rino-faringea, ed è rappresentata da febbre, stato di irrequietezza e pianto ostinato nel lattante, otalgia o dolore alla compressione del trago; con la comparsa di otorrea, indice di perforazione spontanea della membrana timpanica, l'otalgia si risolve. All'otoscopia si evidenzierà una membrana timpanica iperemica, opacata, estroflessa e priva del triangolo luminoso e dei punti di reperi timpanici. Rare, ma temibili sono le possibili complicanze: mastoidite, meningite e ascessi endocranici, ipoacusia [5].

- *Rino-sinusiti ricorrenti.* Poiché i seni paranasali sono in stretta correlazione anatomica con il nasofaringe, e quindi con il tessuto adenoideo, qualsiasi alterazione a carico di queste strutture si ripercuote immancabilmente sulle altre: l'ipertrofia o l'infiammazione adenoidea può essere causa di rino-sinusiti, e viceversa. Nel primo caso ciò è dovuto a una disventilazione delle camere sinusali il cui ostio è parzialmente o totalmente ostruito; nel secondo caso si verificherà una diffusione per contiguità del processo infiammatorio, con la possibile costituzione di un circolo vizioso che si autoalimenta [2]. In realtà, la rinite è una condizione frequentissima in età pediatrica, e risponde principalmente a una eziologia di tipo virale; quando la causa è da imputare alla patologia adenoidea, i microrganismi responsabili sono i batteri, quindi, oltre alla sintomatologia tipica (ostruzione nasale e rinorrea) sarà presente anche la febbre e le secrezioni saranno purulente. Quando, per contiguità, si sviluppa una flogosi sinusale purulenta, si parla di sinusite; questa condizione comporta tipicamente persistenza ed incremento della secrezione nasale (che può divenire francamente purulenta), tosse, soprattutto notturna, cefalea, febbre, espirazione dall'odore pungente, e dolore al volto, in corrispondenza dei seni paranasali sede dell'alterazione [5].
- *Sindromi disventilatorie.* I disordini ostruttivi del sonno risultano estremamente frequenti in età pediatrica, e la causa principale è rappresentata proprio dalla presenza di tonsille e adenoidi ipertrofiche; le manifestazioni, prevalentemente notturne, comprendono: respirazione orale, apnee notturne e russamento, sonno con movimenti agitati, tosse notturna, wheezing, insonnia, enuresi, pavor nocturnus. Le conseguenze di questa condizione possono essere raggruppate in due principali gruppi di fenomeni che comprendono, da un lato, sonnolenza e cefalea diurne associate a irritabilità, difficoltà di concentrazione e calo del rendimento scolastico del bambino; dall'altro, è possibile lo sviluppo graduale di scompenso cardiaco a causa dell'ipossiemia secondaria alle apnee prolungate [2].
- *Modificazioni muscolo-scheletriche del viso.* L'assenza di flusso aereo nasale, a causa dell'ostruzione, viene compensata con la respirazione orale; tale compenso tende ad esacerbarsi nel tentativo di fornire il massimo flusso aereo possibile attraverso la cavità orale. La conseguenza è una crescita delle strutture muscolo-scheletriche facciali prevalentemente lungo l'asse verticale, eliminando il normale contatto tra lingua e palato, e quindi alterando il fisiologico sviluppo dentale [6]. Queste caratteristiche anatomo-funzionali configurano nel loro insieme il quadro della cosiddetta facies adenoidea, caratterizzata da viso inespressivo, naso affilato, labbro superiore retratto con bocca semiaperta, labbro inferiore cadente, malocclusione dentaria e palato ogivale.
- *Disfagia.* Raramente l'aumento del volume tonsillare è tale da interferire con la deglutizione; in questi casi si verifica un'alterazione della fase faringea del processo, tale da essere causa di disfagia soprattutto per i solidi. Nei pazienti con ipertrofia adenoidea, invece, la disfagia può essere dovuta a una incoordinazione tra respirazione e deglutizione, derivante dall'insufficiente flusso aereo nelle camere nasali.
- *Alitosi.* Quando residui di cibo e batteri restano intrappolati all'interno delle cripte di tonsille e adenoidi, può derivare alitosi. Tuttavia, bisogna tener presente che questa condizione può essere conseguenza di molte altre patologie, quali malattia parodontale, reflusso gastroesofageo, infezioni nasali non correlate all'ipertrofia adenoidea.
- *Faringo-tonsilliti ricorrenti.* La sintomatologia caratteristica comprende febbre maggiore di 38°C, linfadenomegalie cervicali superiori a 2 cm, riscontro di essudato tonsillare o positività alla ricerca dello Streptococco Beta-emolitico di gruppo A, principale microrganismo coinvolto in questo tipo di infezione; quando tale quadro si presenta per almeno sette episodi in un anno, cinque episodi in due anni, o tre lungo l'arco di tre anni, si può parlare di condizione ricorrente.

Attualmente il riconoscimento di tale condizione patologica è affidato quasi esclusivamente alla valutazione strumentale di tipo endoscopico, mentre non sono utilizzati marcatori di laboratorio che possano riconoscere e differenziare la condizione di ipertrofia e quella infiammatoria.

In base ai reperti endoscopici riscontrati, è possibile classificare il grado di ostruzione adenoidea, anche se non è stato ancora codificato un sistema di stadiazione uniformemente condiviso [7]. La classificazione di maggior utilizzo è quella ideata da Parikh et al, che distingue quattro gradi di ostruzione in base ai rapporti intercorrenti tra adenoidi ipertrofiche, vomere, palato molle e torus tubarius:

- *grado 1*, volume adenoideo limitato al tetto del naso-faringe;
- *grado 2*, adenoidi che raggiungono la metà superiore del naso-faringe;
- *grado 3*, volume adenoideo che occupa il naso-faringe fino a $\frac{3}{4}$ dello spazio naso-faringeo;
- *grado 4*, adenoidi che determinano ostruzione completa del naso-faringe [8].

Tuttavia non esiste correlazione tra il grado di ostruzione e la sintomatologia che ne deriva, perché le adenoidi sono in stretto rapporto anatomico e funzionale con numerose strutture; quindi, anche piccoli aumenti di volume in sedi critiche possono essere causa di sintomi anche gravi [4].

Per quanto riguarda la diagnosi di ipertrofia tonsillare, l'esame di scelta è la faringoscopia, per la quale viene utilizzata la classificazione di Mackenzie in quattro gradi:

- *grado 1*, tonsille intraveliche, completamente dietro il pilastro tonsillare anteriore;
- *grado 2*, tonsille lievemente ipertrofiche, appena debordanti dal pilastro anteriore;
- *grado 3*, tonsille ipertrofiche, che occupano per $\frac{3}{4}$ lo spazio a disposizione;
- *grado 4*, tonsille marcatamente ipertrofiche, completamente ostruenti la via aerodigestiva (kissing tonsils).

Tradizionalmente, per risolvere la patologia ipertrofico-ostruttiva adeno-tonsillare, la terapia di scelta è di tipo chirurgico. L'intervento di adenoidectomia è indicato in caso di rino-sinusiti e/o adenoiditi ricorrenti, otite media ricorrente, e sindrome da apnee notturne e russamento [6].

Per quanto riguarda la tonsillectomia, c'è indicazione in caso di faringo-tonsilliti ricorrenti (>5 per anno), tonsilliti croniche (sintomi che si protraggono per almeno un anno), ascessi peritonsillari, tonsillite emorragica, e asimmetrie di lato, suggestive di massa neoplastica [6].

Tuttavia, analogamente agli altri interventi chirurgici, anche queste procedure non sono prive di complicanze, seppur rare; le principali sono rappresentate da complicanze connesse all'anestesia (anafilassi, morte), emorragie, immediate o ritardate, ostruzione delle vie aeree, stenosi naso-faringea, edema polmonare, nausea e vomito, dolore locale, odinofagia, otalgia, infezioni, insufficienza velo-faringea, e febbre. Per tale motivo, soprattutto negli ultimi anni, sono stati compiuti studi alla ricerca di una terapia di tipo farmacologico che potesse validamente sostituire la procedura chirurgica. Attualmente, anche in considerazione della fisiopatologia, sono in fase di sperimentazione in quest'ambito farmaci utilizzati nella terapia di controllo della sintomatologia allergica; in particolare sono candidati:

- Montelukast, un antagonista recettoriale dei cistenil-leucotrieni, utilizzato nella prevenzione degli attacchi d'asma e rinite allergica. Il razionale di tale approccio deriva dal riscontro di una elevata espressione di recettori per i cistenil-leucotrieni nei tessuti tonsillari di piccoli pazienti con apnee ostruttive del sonno.
- Corticosteroidi intranasali, utilizzati per sopprimere i mediatori infiammatori prodotti durante le reazioni allergiche [4].

Questi due gruppi di farmaci, infatti, sono in grado di intervenire a diversi livelli della cascata infiammatoria IgE mediata, in grado di scatenare e perpetuare la sintomatologia tipica.

Scopo del lavoro

Prendendo in esame la fisiopatologia delle affezioni adeno-tonsillari, soprattutto alla luce delle considerazioni più recenti riguardanti un possibile ruolo dei meccanismi allergici, è stata formulata l'ipotesi che l'innalzamento dei livelli di alcuni marcatori dell'infiammazione potesse avere un ruolo nella diagnosi di questa condizione. In particolare è stata posta attenzione al riconoscimento dei processi infiammatori a carico delle adenoidi, e al confronto con i pazienti affetti da semplice ipertrofia, in quanto entrambi i gruppi di pazienti presentano una sintomatologia simile. Le molecole valutate sono state:

- *Triptasi*. Tale proteina è stata testata in più casistiche come marcatore di reazioni anafilattiche e, più in generale, di manifestazioni di tipo allergico, riscontrando livelli elevati sia a livello sierico che nelle secrezioni, oppure solo in queste ultime. È presumibile, data la possibile componente allergica, che questa condizione si verifichi anche nell'ambito della patologia adeno-tonsillare, in particolare nei soggetti con flogosi cronica o ricorrente [9].
- *Proteina Cationica Eosinofila (ECP)*. L'aumento della ECP nel siero e/o nelle secrezioni è un indice dell'attività dei granulociti eosinofili; poiché questo tipo di cellule dell'immunità svolge un ruolo dominante nella patogenesi della flogosi allergica, si può ritenere che i livelli di ECP siano alterati anche nelle secrezioni e/o nel siero di pazienti con flogosi ricorrenti delle alte vie aeree, riconducibili a patologia adeno-tonsillare [10].
- *FcγRI-CD64*. Finora il recettore FcγRI-CD64 è stato valutato come marcatore di infiammazione soprattutto nell'ambito di patologie di tipo autoimmune [11-12], dimostrandosi un valido indice per l'individuazione in fase precoce della riattivazione del processo autoimmunitario [16-17], e in alcuni studi sull'individuazione di patologie infettive in pazienti in cui erano presenti solo sintomi aspecifici [18] o in categorie di soggetti nei quali la diagnosi di malattia risulti particolarmente difficoltosa [19].
- *Mieloperossidasi (MPO)*. Tra le principali conseguenze della patologia adeno-tonsillare si può prendere in considerazione l'infezione batterica; poiché in questa condizione le principali cellule effettrici una risposta immunitaria sono i granulociti neutrofili, è possibile che in corso di infezione acuta o ricorrente si verifichino variazioni nei livelli di MPO, in quanto questo enzima rappresenta uno dei principali sistemi di danno tissutale in corso di attività neutrofila [13-14].
- *M130-CD163*. Alla luce delle nuove acquisizioni sulle funzioni di clearance di tale proteina, soprattutto durante processi infiammatori, è presumibile che anche nel caso dell'infiammazione adenoidea e tonsillare i livelli misurati siano più elevati, e che quindi possa rappresentare un buon indice di malattia [15].

Materiali e metodi

Campione dello studio

Lo studio è stato condotto presso la Struttura Complessa di Pediatria della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Sono stati valutati 67 pazienti in età pediatrica affetti da ostruzione respiratoria da ipertrofia adeno-tonsillare, con una storia di episodi ricorrenti (>6 episodi/anno) di infezioni delle alte e basse vie respiratorie, febbre e otiti. La popolazione in studio è composta da 25 femmine e 42 maschi. L'età media del campione è di 4.9 anni (range 2-10 anni). Inoltre, nello studio sono stati inclusi 21 soggetti sani (9 femmine, 12 maschi, età compresa tra 6 e 15 anni, media 11.2 anni), sui quali sono stati valutati solo i monociti FcγRI-CD64 positivi. Su un gruppo di controllo di 25 bambini

sani (10 femmine, 15 maschi, età compresa tra 4 e 9 anni, media 6 anni) è stata dosata la mieloperossidasi (MPO). Su un gruppo di controllo di 54 bambini sani (21 maschi, 33 femmine, età tra 4 e 14 anni, media 9 anni) sono stati valutati su siero i livelli di ECP. Inoltre, sono stati presi in esame, come ulteriore gruppo di controllo, i valori di ECP e triptasi dosati da Marcucci et al [20] su secreto nasale in 10 bambini non atopici (6 maschi, 4 femmine, età compresa tra 8 e 12 anni, media 10.3 anni).

I parametri di valutazione sono stati di 4 ordini:

- Clinico: frequenza (numero delle infezioni) e gravità (sedi interessate: vie aeree superiori o inferiori) delle manifestazioni cliniche.
- Allergologico: sensibilizzazione verso i più comuni pneumo-allergeni (stagionali e perenni) tramite Skin Prick Test.
- Morfologico-endoscopico: volume adenoideo con endoscopia nasale (grado 1-4, classificazione di Parikh), volume tonsillare con faringoscopia (grado 1-4, classificazione di Mackenzie).
- Laboratoristico: conta degli eosinofili circolanti; dosaggio su siero di ECP, Triptasi, M130-CD163 e MPO; dosaggio su secreto nasale di ECP e triptasi; dosaggio su sangue intero di FcγRI-CD64.

Metodiche

Il dosaggio della triptasi è stato eseguito su siero e su secreto mediante metodica fluoro-immunoenzimatica definita ImmunoCAP Tryptase. Possono essere usati campioni di secreto nasale, di plasma e di siero (EDTA o eparina) venoso. I campioni possono essere tenuti a temperatura ambiente (TA) solo a scopo di spedizione, altrimenti da 2°C a 8°C se la determinazione viene eseguita entro una settimana dal prelievo, oppure a -20°C se usati più tardi. L'enzima anti-triptasi, covalentemente legato all'ImmunoCAP, reagisce con la triptasi del paziente. Dopo la fase di lavaggio vengono aggiunti anticorpi anti-triptasi coniugati con l'enzima per formare un complesso. Al termine della fase di incubazione, l'enzima anti-triptasi non legato viene eliminato con il successivo lavaggio e l'immunocomplesso viene messo a contatto con il substrato di sviluppo. Dopo aver bloccato la reazione, si misura la fluorescenza liberata. Per la valutazione dei risultati, le risposte dei campioni sono trasformate in concentrazioni (espresse in µg/L) con l'uso della curva di calibrazione. Gli standard della triptasi sono calibrati contro una sostanza interna di riferimento, purificata da polmone umano secondo Schwartz et al [21]. Il range di dosaggio su siero non diluito è considerato per valori compresi tra 1 e 200 µg/L.

Il dosaggio della Proteina Cationica Eosinofila è stato eseguito su siero e su secreto mediante metodica fluoro-immunoenzimatica definita ImmunoCAP ECP. I campioni sono stati raccolti usando tubi Terumo Venosafe Serum-Gel, poi lasciati per 60-120 minuti a temperatura ambiente (da 20°C a 24°C) per consentire il rilascio dell'ECP mediante il processo di coagulazione, e successivamente centrifugati per 10 minuti a 1,000-1,300 xg, a temperatura ambiente. L'Anti-ECP, covalentemente legato all'ImmunoCAP, reagisce con l'ECP presente del campione. Dopo il lavaggio, si aggiungono anticorpi anti-ECP coniugati con l'enzima per formare un complesso. Dopo l'incubazione, gli anticorpi Enzima-Anti-ECP non legati vengono eliminati tramite lavaggio e il complesso formato viene incubato con un agente di sviluppo. Dopo l'arresto della reazione viene misurata la fluorescenza dell'eluato. Per la valutazione dei risultati, le risposte dei campioni sono trasformate in concentrazioni con l'uso della curva di calibrazione. Le concentrazioni sono espresse in µg/L. I valori standard di ECP sono calibrati contro ECP pura, preparata secondo Peterson, Jörnvall e Venge [22]. Il range di dosaggio su siero non diluito è considerato per valori compresi tra 2 e 200 µg/l.

L'analisi dei monociti FcγRI CD64 è stata eseguita in accordo con una procedura standardizzata descritta da Bakke et al [23]. La metodica prevede l'utilizzo di 50 µl di sangue intero combinato con anticorpi anti-CD64, incubato al buio per 60 minuti. Segue l'emolisi dei globuli rossi del campione e una seconda incubazione di 60 minuti. I campioni vengono infine analizzati con citofluorimetro a flusso FACS Calibur (Becton-Dickinson). I risultati dell'intensità di fluorescenza sono poi convertiti-

ti in scala logaritmica dal software CellQuest version 3.1: l'aumento dell'intensità della fluorescenza lungo l'asse indica un maggior numero di anticorpi marcati legati alla cellula. I risultati sono espressi come percentuale di siti cellulari occupati dall'antigene CD64.

Il dosaggio della Mieloperossidasi è stato eseguito tramite la metodica immunoenzimatica Quantikine-Human MPO Immunoassay. Possono essere utilizzati campioni di colture cellulari, cellule lisate, siero, plasma, saliva, urine. Entro 30 minuti dalla raccolta, i campioni vengono centrifugati per 15 minuti a 1,000 xg, a una temperatura tra 2 e 8°C; successivamente segue una seconda centrifugazione per 10 minuti a 10,000 xg a una temperatura tra 2 e 8°C, per rimuovere completamente le piastrine dal campione. La metodica di analisi prevede l'utilizzo della tecnica immunoenzimatica a sandwich: un anticorpo monoclonale specifico per la MPO viene precedentemente fissato su micro piastra, e successivamente messo a contatto col campione da valutare. Dopo il lavaggio per la rimozione dei componenti non legati, viene aggiunto un anticorpo policlonale specifico per la MPO legato a un enzima. Dopo un secondo lavaggio di rimozione si aggiunge una soluzione substrato che, legandosi all'enzima, permette una valutazione colorimetrica in base alla quantità di MPO presente nel campione analizzato. Le concentrazioni sono espresse in ng/mL. Il saggio è calibrato contro una MPO ricombinante umana prodotta secondo R&D System. Il range di dosaggio su siero è considerato per valori compresi tra 209 e 1,799 ng/mL.

Il dosaggio di M130-CD163 è stato eseguito tramite la metodica immunoenzimatica Quantikine-HumaCD 163 Immunoassay. Possono essere utilizzati campioni di colture cellulari, cellule lisate, siero, plasma, saliva, urine. Entro 30 minuti dalla raccolta, i campioni vengono centrifugati per 15 minuti a 1,000 xg, a temperatura ambiente. La metodica di analisi utilizza la tecnica immunoenzimatica a sandwich: un anticorpo monoclonale specifico per il M130-CD163 viene precedentemente fissato su micro piastra, e successivamente messo a contatto col campione da valutare. Dopo il lavaggio per la rimozione dei componenti non legati, viene aggiunto un anticorpo policlonale specifico per M130-CD163 legato a un enzima. Dopo un secondo lavaggio di rimozione si aggiunge una soluzione substrato che, legandosi all'enzima, permette una valutazione colorimetrica in base alla quantità di M130-CD163 presente nel campione analizzato. Le concentrazioni sono espresse in ng/mL. Il saggio è calibrato contro M130-CD163 ricombinante umano prodotto secondo R&D System. Il range di dosaggio su siero è considerato per valori compresi tra 88 e 902 ng/ml.

Analisi statistica

I dati riguardanti i pazienti sono stati caricati su un programma di archiviazione e successivamente la loro elaborazione è stata effettuata con l'ausilio di un programma di statistica (pacchetto MedCalc versione 9.5). Sono state dapprima effettuate delle analisi descrittive. I valori dei dosaggi sono stati espressi come mediana (md) e 25° e 75° percentile (IQR). Il confronto di tutti i parametri indagati è stato valutato con il test di Mann Whitney e test t di Student. Tramite il coefficiente rho di Spearman sono state anche ricercate possibili correlazioni tra i parametri quantitativi presi in esame. Infine, è stato creato un modello di regressione logistica per predire i pazienti con volume adenoideo pari a 3 oppure pari a 4. Sono stati considerati significativi i valori di $p \leq 0.05$.

Risultati

I 67 pazienti sono stati suddivisi in gruppi, sulla base delle valutazioni cliniche e strumentali (Tabella 1). Come illustrato in tabella 2, il confronto dei valori sierici di ECP tra i pazienti e il gruppo di controllo ha mostrato una differenza statisticamente significativa (p -value < 0.0001 , Figura 1A). Inoltre, i valori di MPO dei pazienti sono significativamente (p -value < 0.0001 , Figura 1B) più

elevati rispetto al gruppo di controllo. Infine, la medesima differenza si trova prendendo in considerazione i livelli sierici di CD163 (p-value <0.0001, Figura 1C). Le altre variabili indagate non evidenziano differenze significative tra gruppo di controllo e pazienti.

Prendendo in considerazione l'allergia, i livelli di MPO sono significativamente (p-value =0.0355) più elevati in bambini allergici rispetto ai bambini non allergici, come mostrato in figura 2.

Successivamente, valutando la frequenza e gravità del quadro clinico, è risultato che i livelli sierici di ECP sono significativamente (p-value =0.0012) più elevati nel gruppo di bambini che durante l'anno presentava più di 6 episodi di infiammazione alle alte vie aeree, rispetto a chi non le presentava (Figura 3). Inoltre, è stata trovata una differenza statisticamente significativa (p=0.0080) dei livelli di MPO tra i pazienti con infiammazione alle basse vie aeree ed i pazienti che non presentavano infiammazione alle basse vie aeree (Figura 4).

Considerando il volume adenoideo dei pazienti, i livelli sierici di CD163 sono significativamente (p-value =0.0366) più elevati nei bambini con volume adenoideo pari a 4 rispetto ai bambini con volume pari a 3, come mostrato in figura 5A. Medesimo trend è stato osservato considerando i livelli dei monociti FcγRI-CD64, espressi come numero di siti, che sono significativamente (p-value =0.0176) più elevati nei bambini con volume adenoideo pari a 4 rispetto ai bambini con volume adenoideo pari a 3 (Figura 5B).

Il modello di regressione logistica trovato ha un valore di p=0.0017 e considera come predittive le variabili: presenza di apnee, infiammazioni ricorrenti alle alte vie aeree (RURTI), livelli sierici di CD163. Vengono predetti correttamente 32/42 pazienti (76%). Il modello stima la probabilità del grado del volume adenoideo tramite la seguente formula:

$$p(\text{risposta}) = \exp(-1.13 + 0.41 * \text{RURTI} + 2.46 * \text{apnee} + 0.0023 * \text{CD163}) / [1 + \exp(-1.13 + 0.41 * \text{RURTI} + 2.46 * \text{apnee} + 0.0023 * \text{CD163})].$$

Tale modello di predizione è stato considerato corretto quando la p (risposta) è inferiore a 0.05 per i pazienti con volume adenoideo pari a 3 oppure superiore a 0.05 per i pazienti con volume adenoideo pari a 4.

Infine, correlando tra loro le variabili quantitative indagate è risultato che: i livelli sierici di ECP correlano in modo statisticamente significativo con i livelli di eosinofili circolanti (p-value =0.0170, rho =0.294, Figura 6A). Inoltre, i livelli di MPO correlano in modo statisticamente significativo con i livelli sierici di ECP (p-value =0.0096, rho =0.400, Figura 6B). I valori dei monociti FcγRI-CD64 (espressi in %) nei pazienti correlano in modo significativo con i livelli di MPO (p-value =0.0142, rho =0.388, Figura 7A) e con i livelli sierici di ECP (p-value =0.0033, rho =0.415, Figura 7B). I valori dei monociti FcγRI-CD64 (espressi come numero di siti) nei pazienti correlano in modo significativo con i livelli di CD163 (p-value =0.0041, rho =0.454, Figura 8A) e con i livelli sierici di ECP (p-value =0.0025, rho =0.428, Figura 8B).

Discussione

L'ipertrofia adeno-tonsillare è un disturbo di peculiare rilevanza in età pediatrica, e il possibile utilizzo di metodiche diagnostiche di ausilio all'endoscopia può essere di grande utilità, soprattutto nella prospettiva di nuove strategie terapeutiche non chirurgiche. In considerazione della rilevanza della patogenesi immuno-mediata delle affezioni adeno-tonsillari, il nostro studio si è prefisso di valutare marcatori coinvolti nella risposta infiammatoria, in particolare di tipo allergico, al fine di individuarne la possibile utilità diagnostica in quest'ambito.

Come primo esito, è stata individuata una relazione significativa tra i livelli di ECP nel siero e la presenza di sintomatologia suggestiva di ipertrofia adeno-tonsillare, a dimostrazione del fatto che tale affezione può riconoscere un'origine di tipo allergico ed essere causa di uno stato infiammatorio subacuto che, periodicamente, si palesa con la comparsa dei sintomi tipici. Inoltre, tale constatazione è confermata dalla correlazione tra i livelli di ECP e le variazioni degli eosinofili, principale linea cellulare coinvolta nella risposta di tipo allergico. Tuttavia, contrariamente alle aspettative, non è stato riscontrato un aumento significativo dei livelli di ECP nei pazienti allergici. Presumibilmente, l'assenza di questa relazione può essere spiegata dal fatto che l'allergia non è stata valutata in relazione al tipo di allergeni, in particolare stagionali o perenni. Di conseguenza, è possibile che al momento dello studio i pazienti non risultassero esposti agli pneumo-allergeni in questione.

Analoghe considerazioni possono essere fatte anche per le variazioni dei livelli di triptasi, sebbene i risultati non siano significativi. Tale molecola, infatti aumenta nel siero in caso di sensibilizzazione ad allergeni e nello shock anafilattico, per cui è possibile spiegare l'assenza di significatività con la mancata suddivisione in gruppi dei pazienti allergici, in relazione al tipo di allergeni a cui risultavano sensibilizzati.

Per quanto riguarda i livelli di MPO, è possibile concludere che, dal momento che le variazioni correlano con la comparsa della sintomatologia tipica dell'ipertrofia adeno-tonsillare in presenza di un'anamnesi allergica, l'aumento di tale marcatore è suggestivo di un'ipertrofia determinata da un rilevante contributo dei meccanismi immunomediati di tipo I; sulla base di tali asserzioni, può essere utile intervenire con una terapia adeguata di tipo farmacologico, in modo da limitare l'incremento di volume attraverso l'interruzione del circolo vizioso perpetuato dalla reazione immunitaria mediata da meccanismi allergici. Inoltre, per la particolare correlazione con le infezioni delle basse vie aeree, la MPO può essere considerata un valido candidato all'utilizzo a scopo diagnostico nell'ambito delle affezioni adeno-tonsillari, soprattutto quando queste si manifestano con sindromi cliniche non direttamente riconducibili ai meccanismi di ipertrofia.

Il recettore FcγRI-CD64 risulta aumentato in maniera significativa in quei pazienti che all'endoscopia presentavano un grado di ipertrofia pari a 4, secondo lo score di Parikh. Quindi i livelli variano in relazione alla gravità dell'ipertrofia. A questo proposito, è opportuno puntualizzare che un elevato grado di ipertrofia adenoidea non necessariamente correla con sintomi clinici gravi e viceversa, dal momento che anche un aumento lieve di volume, in aree critiche, può essere causa di sindromi cliniche gravi. Tuttavia, in caso di sintomatologia suggestiva, l'aumento dei livelli di FcγRI-CD64 può risultare un buon indicatore di patologia, in particolare nell'ambito di una possibile resezione degli aggregati ipertrofici.

Analogamente, M130-CD163 aumenta proporzionalmente con il volume adenoideo, in concomitanza con FcγRI-CD64. In particolare è stata riscontrata una correlazione con un grado elevato di ipertrofia. Da qui è stato possibile generare un modello di predizione del volume adenoideo. Tale modello considera predittive le variabili: presenza di apnee notturne, flogosi delle alte vie respiratorie e livelli sierici di CD163. Questi due gruppi di sintomi, infatti, sono tra i più suggestivi di ipertrofia, da un punto di vista clinico. Secondo tale modello, elevati livelli di CD163, presenza di apnee notturne e presenza di flogosi alle alte vie respiratorie sono suggestivi di volume adenoideo pari a 4, con una efficienza complessiva del 76%.

Infine è stata riscontrata la correlazione dei livelli di MPO con quelli di ECP, a ulteriore dimostrazione della presenza di una componente immuno-allergica nella patogenesi dell'ipertrofia adeno-tonsillare.

I monociti FcγRI-CD64 aumentano proporzionalmente con i livelli di queste ultime due variabili, così da supportare il ruolo che questo marcatore può assumere anche nella diagnosi di tali affezioni, oltre che delle patologie di tipo infettivo e autoimmune per le quali già viene utilizzato. Inoltre, è possibile fare analoghe considerazioni per quanto riguarda la correlazione dei livelli di FcγRI-CD64 con quelli di M130-CD163 e di ECP.

In conclusione, in considerazione dei risultati ottenuti, è possibile suffragare l'ipotesi che l'utilizzo clinico di FcγRI-CD64 e M130-CD163 possa essere utile nel riconoscimento della gravità del grado dell'ipertrofia, soprattutto nell'individuazione di un momento adeguato in cui programmare la resezione chirurgica. I livelli di MPO, invece, possono risultare utili nel riconoscimento dell'origine di alcuni quadri dall'eziologia dubbia, come nel caso di infezioni delle basse vie aeree, estremamente frequenti in età pediatrica, e che non sempre riconoscono un *primum movens* ben determinabile; in tal modo è possibile correlare una sintomatologia tipicamente di tipo cronico-ricorrente con un processo di tipo progressivo che, sebbene parafisiologico, può essere causa di affezioni anche gravi con conseguenze a lungo termine altrettanto pericolose.

Tabelle e figure

Tabella 1. Descrizione demografica del campione oggetto dello studio.

67 pazienti (25 femmine, 42 maschi, età media 4.9 anni)				
	SI		NO	
Allergia (risposta positiva agli SPT)	9		58	
Flogosi ricorrenti alte vie aeree °	20		47	
Flogosi ricorrenti basse vie aeree °	7		60	
Russamento	61		6	
Apnee	43		24	
	Grado 1	Grado 2	Grado3	Grado 4
Volume adenoideo (classificazione di Parikh)	0	0	35	32
Volume tonsillare (classificazione di Mackenzie)	24	10	25	8

Tabella 2. Mediana (md) e 25°-75° percentie (IQR) delle variabili indagate, tenendo separati il gruppo di controllo e i pazienti, e p-value dato dal confronto tra le due popolazioni.

	Gruppo controllo	Pazienti	p-value
ECP sierica	md: 6.8 µg/L IQR: 2.4-9.1 µg/L	md: 17.9 µg/L IQR: 7.14-30.8 µg/L	<0.0001
TRIPTASI sierica		md: 3.04 µg/L IQR: 2.43-4.01 µg/L	
MPO	md: 315 ng/ml IQR: 199-451 ng/ml	md: 1305.5 ng/ml IQR: 879.3-2,975 ng/ml	<0.0001
CD163	md: 472 ng/mL IQR:205-702ng/mL	md: 1249.8 ng/mL IQR:872.4-1,443 ng/mL	<0.0001
ECP dosata su secreto	md: 9.3 µg/L	md: 6.45 µg/L IQR: 1.8-64.3 µg/L	ns
TRIPTASI su secreto	md: <1 µg/L	md: 1.23 µg/L IQR: 0.8-2.83 µg/L	ns
FCγ RI (%)	md: 14.08% IQR: 10.8-16.47 %	md: 11.32% IQR: 8.22-19.87 %	ns
FCγ RI (# siti)	md: 2,299 IQR: 2,147-2,388	md: 2,305 IQR: 2,100.5-2,402.8	ns

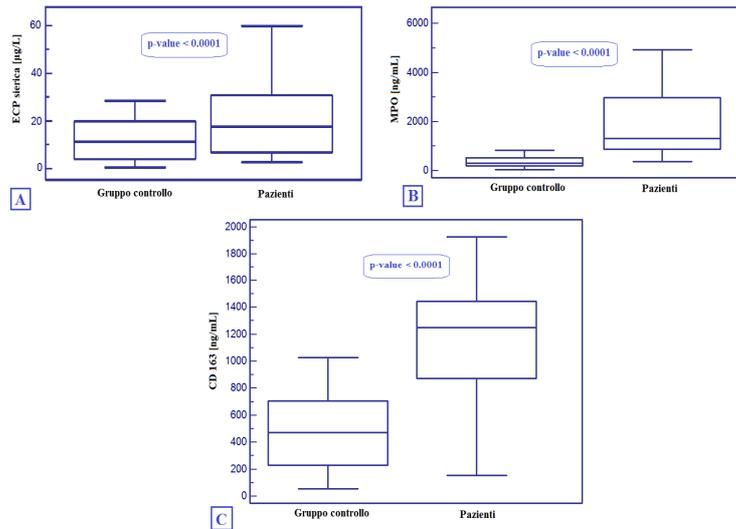


Figura 1. Distribuzione di ECP sierica (A), MPO (B) e M130-CD163 (C) nel gruppo di controllo e nei pazienti. I dati sono espressi come mediana (linea nera), 25°-75° percentile (estremi della scatola) e valori minimo e massimo (linee verticali). Sono riportati anche i p-value dei confronti.

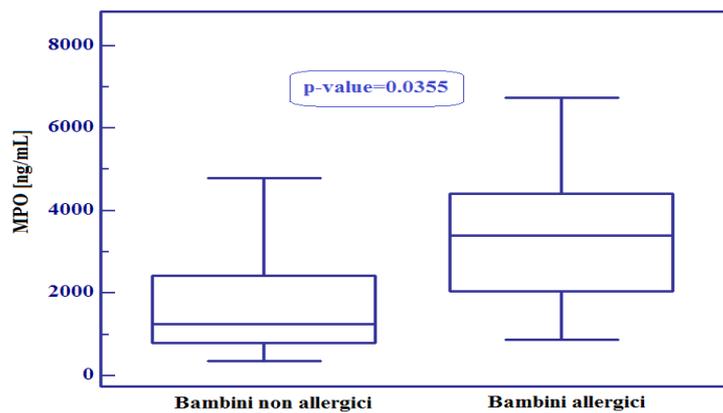


Figura 2. Distribuzione dei livelli sierici di MPO nel gruppo di bambini non allergici e allergici. I dati sono espressi come mediana (linea nera), 25°-75° percentili (estremi della scatola) e valori minimo e massimo (linee verticali). Viene riportato anche il p-value del confronto.

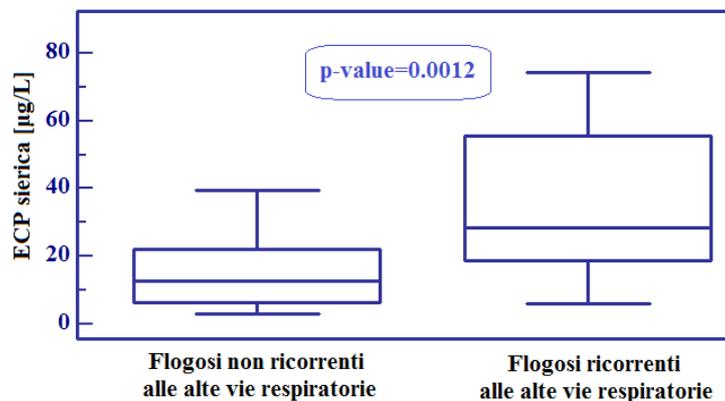


Figura 3. Distribuzione dei livelli sierici di ECP nel gruppo di bambini con o senza flogosi ricorrenti alle alte vie aeree. I dati sono espressi come mediana (linea nera), 25°-75° percentile (estremi della scatola) e valori minimo e massimo (linee verticali). Viene riportato anche il p-value del confronto.

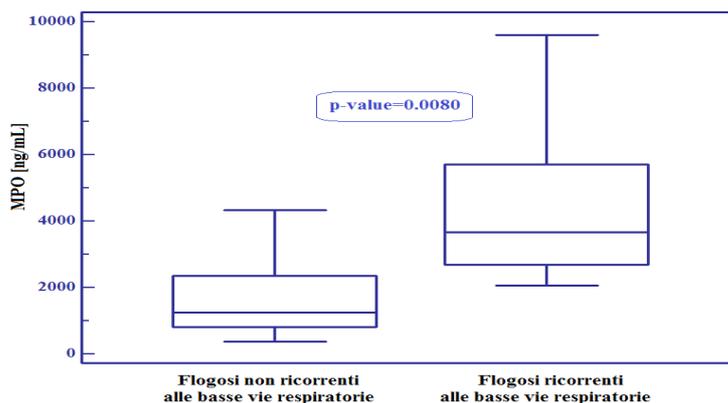


Figura 4. Distribuzione dei livelli sierici di MPO nel gruppo di bambini con o senza flogosi ricorrenti alle basse vie aeree. I dati sono espressi come mediana (linea nera), 25°-75° percentili (estremi della scatola) e valori minimo e massimo (linee verticali). Viene riportato anche il p-value del confronto.

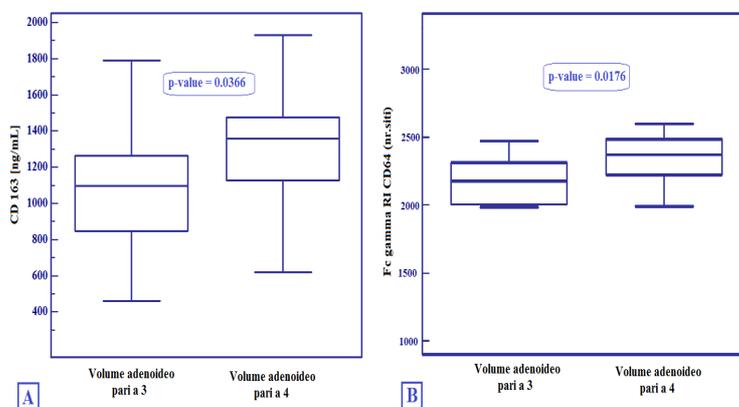


Figura 5. Distribuzione di CD163 sierica (A) e Fc γ RI-CD64 (B) nel gruppo di bambini con volume adenoidico pari a 3 e pari a 4. I dati sono espressi come mediana (linea nera), 25°-75° percentili (estremi della scatola) e valori minimo e massimo (linee verticali). Sono riportati anche i p-value dei confronti.

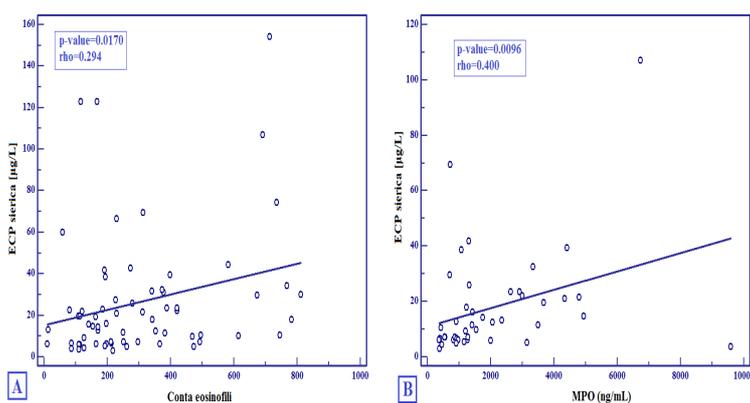


Figura 6. Correlazione tra ECP sierica e conta degli eosinofili (A) e tra ECP sierica e livelli sierici di M130-CD163. Vengono riportati p-value e coefficiente rho della correlazione di Spearman.

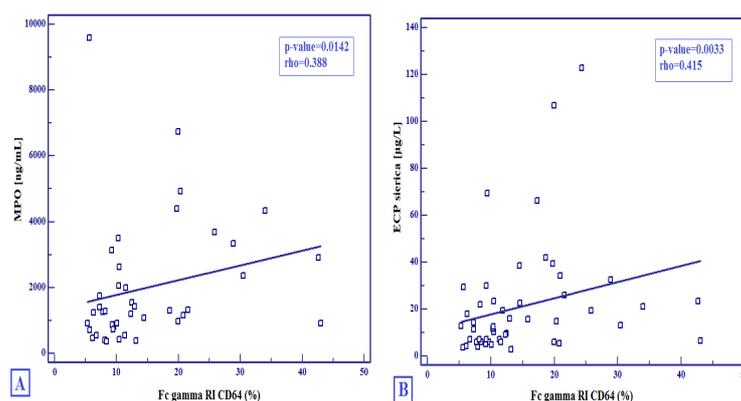


Figura 7. Correlazione tra FcγRI-CD64 (%) e livelli sierici di MPO (A) e tra FcγRI-CD64 (%) e livelli sierici di ECP (B). Vengono riportati p-value e coefficiente rho della correlazione di Spearman.

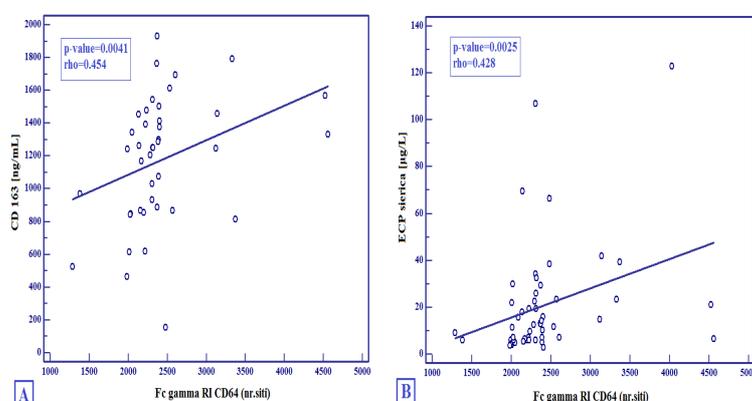


Figura 8. Correlazione tra FcγRI-CD64 (numero di siti) e livelli sierici di M130-CD163 (A) e tra FcγRI-CD64 (numero di siti) e livelli sierici di ECP (B). Vengono riportati p-value e coefficiente rho della correlazione di Spearman.

Bibliografia

1. Crescita Oro-rino-maxillo-facciale e adenotonsillectomia (per motivi meccanici). *Edizioni Milella*, Lecce, IT 1993.
2. Van Cauwenberge PB, Bellussi L, Maw AR et al. The adenoid as a key factor in upper airway infections. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 1995;32:S71-S80.
3. Marseglia GL, Poddighe D, Caimmi D et al. Role of Adenoids and Adenoiditis in Children With Allergy and Otitis Media. *Current Allergy and Asthma Reports* 2009;9:460-464.
4. Scadding G. Non-surgical treatment of adenoidal hypertrophy: The role of treating IgE-mediated inflammation. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:1095-1106.
5. *Pediatria essenziale. Ed UTET*, Torino, IT 1997.
6. Darrow DH, Siemens C. Indications for Tonsillectomy and Adenoidectomy. *Laryngoscope* 2002;112:6-10.
7. Josephson GD, Duckworth L, Hossain J. Proposed Definitive Grading System Tool for the Assessment of Adenoid Hyperplasia. *Laryngoscope* 2011;121:187-193.
8. Parikh SR, Coronel M, Lee JJ et al. Validation of a new grading system for endoscopic examination of adenoid hypertrophy. *Otolaryngology. Head and Neck Surgery* 2006;135:684-687.
9. Payne V, Kam PC. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* 2004;59:695-703.
10. Bystrom J, Amin K, Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic protein – a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respiratory Research* 2011;12:10.
11. Nuutila J, Hohenthal U, Laitinen I et al. Simultaneous quantitative analysis of FcγRI (CD64) expression on neutrophils and monocytes: A new, improved way to detect infections. *Journal of Immunological Methods* 2007;328:189-200.

12. Van der Poel CE, Spaapen RM, van de Winkel JG et al. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI. *J Immunol* 2011;186(5):2699-2704.
13. Van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(11):2899-2937.
14. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005;77:598–625.
15. Onofre G, Kolářčková M, Jankovičová K et al. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica* 2009;52(2):57-61.
16. Li Y, Lee PY, Sobel ES et al. Increased expression of FcγRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis Res Ther* 2009;11:1.
17. Lee DJ, Rea TH, Modlin RL et al. Activation of FcγRI on Monocytes Triggers Differentiation into Immature Dendritic Cells That Induce Autoreactive T Cell Responses. *J Immunol* 2009;183:2349-2355.
18. Cid J, Aguinaco R, Sanchez R et al. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection* 2010;60:313-319.
19. Morsy AA, Elshall LY, Zaher MM et al. CD64 cell surface expression on neutrophils for diagnosis of neonatal sepsis *Egypt J Immunol* 2008;15(2):53-61.
20. Marcucci F, Sensi L, Frati F et al. Sublingual tryptase and ECP in children treated with grass pollen sublingual immunotherapy (SLIT): safety and immunologic implications. *Allergy* 2001;56:1091-1095.
21. Schwartz LB. Mediators of human mast cell and human mast cell subsets. *Annals of Allergy* 1987;58:226-237.
22. Peterson CGB, Jörnvall H, Venge P. Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils. *Eur J Haematol* 1988;40:415-423.
23. Bakke AC, Allen E, Purtzer MZ et al. Neutrophil CD64 expression Distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2001;1:267-275.