



*fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus  
italian cystic fibrosis research foundation*

## III Seminario di Primavera

Verona 13 - 14 maggio 2005

Screening dei portatori, Difetto di base,  
Cellule staminali, Controllo Infezione



*fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus  
italian cystic fibrosis research foundation*

Ospedale Maggiore - Piazzale Stefani, 1 - 37126 VERONA  
Tel. 045 8073438 - Fax 045 8073568 - e-mail: [fondazione.ricercafc@azosp.it](mailto:fondazione.ricercafc@azosp.it)  
[www.fibrosicisticaricerca.it](http://www.fibrosicisticaricerca.it)

con la sponsorizzazione di



Associazione degli Industriali  
della Provincia di Verona

In copertina: "Ricercatrice in Primavera" di Isabella Zago, allieva Liceo Artistico Boccioni di Verona





*Fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus*  
*italian cystic fibrosis research foundation*

## **III Seminario di Primavera**

Verona 13 – 14 maggio 2005

# **Progressi Recenti e Sviluppi Futuri nella Ricerca sulla Fibrosi Cistica**

## **Riassunto dei contributi**

### **INDICE**

<b>Presentazione</b>	Pag. 2
<b>Lidewij Henneman:</b> Nuove strategie ed opinioni sullo screening dei portatori CF	Pag. 3
<b>William Guggino:</b> Acquisizioni sulla macchina secretiva epiteliale e prospettive di terapia del difetto di base CF	Pag. 10
<b>Guoshun Wang:</b> Terapia della fibrosi cistica basata su cellule staminali	Pag. 12
<b>Dieter Gruenert:</b> Commento alla pubblicazione di G. Wang su cellule staminali	Pag. 18
<b>Roberto Buzzetti e Cesare Braggion:</b> Prevenzione e controllo dell'infezione respiratoria in fibrosi cistica	Pag. 22
<b>Moderatori del Seminario</b>	Pag. 27

Lo scopo dei Seminari di Primavera, giunti quest'anno alla terza edizione, è quello di dare evidenza ad alcuni dei problemi emergenti nel campo della fibrosi cistica, verso i quali si sta muovendo un significativo interesse di studio e ricerca. Viene chiesto per questo l'aiuto di persone che hanno dato di recente contributi rilevanti a queste problematiche, con l'invito a prospettare ipotesi nuove di lavoro e linee possibili di sviluppo di ricerca. Il carattere di seminario include l'ampio spazio che viene dato alla comunicazione degli esperti ma anche alla discussione che ne dovrebbe seguire.

Il primo tema, affrontato dalla Dr.essa **Lidewij Henneman**, una studiosa di Amsterdam attenta alle dinamiche sociali e alle iniziative di prevenzione che si sviluppano intorno all'impatto delle malattie genetiche sulla popolazione, riguarda il ripensamento allo screening dei portatori del gene CFTR. I tentativi di offrire alla popolazione la possibilità di identificare il loro stato di eterozigote per questo gene hanno una storia ormai di 15 anni, data dalla scoperta del gene CFTR. A tutt'oggi, non pare esservi una strategia condivisa sull'opportunità e sulla fattibilità di uno screening di popolazione. La Dr.essa Henneman riferisce dell'esperienza olandese e ricapitola per noi le controversie storiche ed i pochi punti fermi cui forse si sta arrivando.

Il Dr **William Guggino**, biologo molecolare di Baltimora, uno dei più attivi studiosi di fisiopatologia della proteina CFTR, riferisce delle nuove conoscenze acquisite sui meccanismi di maturazione e di funzionamento di questa proteina canale, soprattutto nella sua interazione con altre proteine nella complessa macchina cellulare che porta all'azione di trasporto del cloro nella membrana apicale. Abbiamo chiesto al Dr Guggino di tentare

anche di illuminare le prospettive che si aprono oggi verso terapie del difetto di base come sviluppo di queste nuove conoscenze.

Una tematica calda che sta attraendo oggi molti gruppi di ricerca è quella delle cellule staminali, embrionali o adulte, per le potenzialità che esse hanno di essere impiegate per la terapia riparativa di parecchie malattie su base degenerativa, incluse alcune malattie genetiche. La fibrosi cistica si candida tra queste, con l'ipotesi che cellule staminali indifferenziate possano essere veicolate e trapiantate a livello polmonare dopo aver subito una correzione genica ed essere state indotte a moltiplicarsi e differenziarsi in cellule respiratorie. Siamo certamente ai primi passi per questa strategia. Al Dr **Guoshun Wang** di New Orleans, che con il suo gruppo ha recentemente prodotto risultati preliminari molto interessanti, specificamente mirati alla fibrosi cistica, è stato chiesto di farci il punto sulla ricerca attiva in questo promettente filone.

In questo Seminario abbiamo voluto inserire anche un breve report conclusivo sullo studio di revisione della letteratura, condotto da un gruppo che si è attivato nell'ambito della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, sulla prevenzione e il controllo dell'infezione respiratoria in fibrosi cistica. Si tratta di una vasta rassegna critica di tutto ciò che è stato prodotto negli ultimi anni su questo tema assai controverso, che coinvolge peraltro in maniera pesante i comportamenti dei centri di cura e le ansie dei malati e delle famiglie. Riferirà nella sessione scientifica il Dr **Roberto Buzzetti**, che è stato il coordinatore e la guida di questo gruppo e, nella sessione divulgativa, il Dr **Cesare Braggion**, uno degli autori del volume che raccoglie i risultati di questa fatica e che viene distribuito ai partecipanti del Seminario.

## Lidewij Henneman:

Department of Clinical Genetics  
and Human Genetics, VU University  
Medical Center, Amsterdam, The  
Netherlands

# Nuove strategie ed opinioni sullo screening dei portatori CF



La dr.ssa Lidewij Henneman, scienziata della salute, ottenne nel 2002 il titolo di PhD al VU University Medical Center di Amsterdam discutendo la tesi (promossa dal Prof. LP ten Kate) su "Preconceptional cystic fibrosis carrier screening – desirability and feasibility in The Netherlands". Ha ricevuto il premio "Dutch Public Health Award" per questo progetto di ricerca. La dr.ssa Henneman è ora ricercatrice senior all'Istituto di ricerca per la Medicina Extramurale (EMGO) presso il dipartimento di Salute Pubblica ed Occupazionale, di Genetica Clinica e Genetica Umana. I suoi interessi di ricerca sono nel campo della genetica di comunità, specialmente degli screening genetici. Essa supervisiona e coordina ricerche di persone in formazione su diverse tematiche: barriere e possibilità per l'implementazione di screening genetici, rischi della comunicazione nel tumore ereditario della mammella, conoscenze pubbliche e professionali e attitudini verso gli sviluppi della genetica, relazione tra informazione del rischio genetico, l'immagine di sé stessi e i comportamenti di salute. Lidewij Henneman è segretaria dell'associazione olandese di genetica di comunità nonché membro del gruppo di lavoro olandese sull'assistenza preconcezionale.

### The purpose of CF population-based carrier screening

For many autosomal recessive diseases, such as cystic fibrosis (CF), it is possible to investigate whether a person is an unaffected carrier. If both partners are carrier, each child has a 1-in-4 risk of having CF. Population carrier screening is possible because there is a suitable test available and it merits evaluation because CF is a relatively common, serious disease, leading to significant morbidity and early death. Furthermore, reproductive options are available for identified carrier couples. Most carriers do not know that they are a carrier, so they are not aware of their risk and, in most cases, the diagnosis of a child with CF is highly unexpected. Over 80% of the patients are born in families with no history of CF, and it has therefore been suggested that CF carrier screening in the general population is warranted (Williamson, 1993). In addition, Holloway and Brock (1994) have shown that only 8%–24% of all carrier couples would be detected if testing the relatives of CF patients was restricted to the second cousin level and closer (so called "cascade testing").

Population-based carrier screening programmes aimed at the identification of CF carrier status in couples before the birth or conception of a child, make it possible to inform these couples about their risk of having a child with CF. The purpose of CF carrier screening then is to offer these couples the opportunity to anticipate on this increased risk, and to make informed reproductive decisions. Possible reproductive options for carrier couples include e.g. avoiding pregnancy, acceptance of the risk of having a child with CF, prenatal diagnosis and selective termination of the pregnancy, or preparation for a child with CF. Although one of the consequences of screening may be a reduction

in the number of births of children with CF, or a reduction in the costs of health care, such reductions are not a purpose of the screening. A screening programme that results in a strong reduction in the number of children born with CF, but does not enable participants to make an autonomous informed decision, fails completely.

## Target groups for carrier screening

In most countries, population screening for CF carriers is not included in standard medical care, and the debate centres on the question of whether it is, indeed, desirable, although support for screening is growing. Carrier screening can theoretically take place at different times throughout life. Possible target groups are pregnant women and their partners (pregnancy or prenatal screening), individuals or couples before pregnancy (preconceptional screening), school-age children (school screening), and newborns (neonatal screening). Each approach has its own pros and cons (Wildhagen et al., 1998). Carrier screening on newborns and school children is generally inadvisable due to the time-lapse until the information is useful and the fact that those tested cannot decide for themselves whether or not they want to know if they are a carrier (Williamson et al., 1993; Wildhagen et al., 1998). Screening all individuals of reproductive age is unlikely to be systematic, as many people will not consider testing to be relevant. Pregnancy screening and preconceptional couple screening seem to be the best options for targeting future parents. Pregnancy screening has a practical advantage because of existing facilities, and since most pregnant women contact their general practitioner or visit antenatal clinics, the target group is easy to reach. A disadvantage is that this type of screening leaves limited reproductive options if both partners are carriers, and might impose a time constraint when decisions about prenatal diagnosis have to be made. Preconceptional screening provides a maximum number of reproductive options and a minimum of (time) constraint (Raeburn et al., 1994), and is worldwide considered to be the most appropriate strategy for CF carrier screening. However, one disadvantage of preconceptional screening is the absence, in most countries, of a preconceptional consultation system, and there-

fore considerable effort must be made to reach the target population, i.e. those contemplating pregnancy. Given the limited resources that are available for preconceptional health care, and the fact that in most countries an antenatal infrastructure already exists, most CF carrier screening programmes aim at screening during pregnancy.

In the Netherlands, where the percentage of planned pregnancies is high (85%) (De Walle et al., 1999), preconceptional screening seems to be the most suitable option. Prenatal screening could be used as a 'safety net' for pregnant women who do not attend preconceptionally.

## Attitudes towards preconceptional carrier screening

In general, the target population has positive attitudes towards preconceptional carrier screening (Poppelaars et al., 2004a; Henneman et al., 2003). Research has also shown that most parents of children with CF report that they wish they had known their risk beforehand (Henneman et al., 2001), therefore an increase in the number of prospectively identified carrier couples seems desirable. In addition, several studies have demonstrated that most CF patients and their relatives have a positive attitude towards a routine offer of CF screening in the population (Conway et al., 1994; Watson et al., 1991).

A questionnaire study among 102 potential providers of screening (representative sample of Dutch GPs) has shown that 55% had a positive attitude towards routinely offering screening, and more than 80% was in favour of informing the target population about the possibility of having a carrier test (Poppelaars et al., 2004b). Other studies confirm these results (Boulton et al., 1996; Watson et al., 1991).

## Ethical considerations

An important criterion that is applied to genetic screening programmes is that they should only be considered if the beneficial aspects outweigh the harmful aspects in screening. The introduction of genetic carrier screening programmes in the general population raises many psychosocial, ethical, legal and economic issues and concerns. The possi-



ble adverse effects of screening include anxiety caused by information which cannot be used to make positive personal choices; undue pressure on individual choice; social stigmatisation of individuals who might decline an offer of screening; misuse of the information, and discrimination based on test-results after disclosure to third parties such as insurers or employers. Screening also has implications for families, since it not only involves the individual being tested, but also other family members who have not consented to testing. Carrier detection has also raised the question of whether the option of terminating an affected pregnancy devalues the lives of CF patients or impedes the search for a cure (Haddow et al., 1999). Furthermore, questions related to the wide clinical and ethnic variability, and the changing prognosis of the disease have been raised, including a huge anticipated burden that it would impose on genetic counselling resources (Grody et al., 2001).

One of the main technical problems with CF carrier screening is that the test to identify carriers is not 100% sensitive, because not all mutations are known (in most populations that are of European origin, approximately 90-95% of CF mutations can be detected). This means that for couples in which a mutation is detected in one of the partners, while the other is negative tested, there will still be a chance that they are a carrier couple. Consequently, these so-called +/- couples might be more anxious because they will have a residual risk of having a child with CF while they cannot be offered clear options, such as prenatal diagnosis. Special attention must be paid to this imperfect test-sensitivity in the education and counselling provided when screening is offered.

## Results of a research study on preconceptional screening

Preconceptional CF carrier screening of couples has been investigated in a large research study in the Netherlands, between 1997-2000 (Henneman et al., 2003). Over 38,000 persons, aged 20-35 years, were invited by mail either by the Municipal Health Services (MHS) or by their general practitioner (GP) to participate in a screening programme with their partner if they were planning a pregnancy. Pre-test

counseling was provided either during a group session or during a GP consultation. Of those who received an invitation, 20% had a partner with whom they were planning children. Participation varied according to the pre-test setting, with the primary care setting producing the highest rate of attendance (25%). Whether letters were sent by MHS or GP had no influence on participation. 559 couples (96%) consented to testing after education. The main reason given for not responding to the invitation was 'lack of time to attend' (48%). Very few couples reported that they had participated only because they felt they could not refuse. In total 69% of non-participants and 89% of participants believed that screening should be offered to all couples that are planning a pregnancy. Eighteen CF carriers were identified; their partners tested negative. Eight participants reported feeling worried, and seven carriers reported, when asked, that they felt less healthy (Henneman et al., 2002). Nevertheless the results suggest that these drawbacks are tolerable, since the same subjects would decide to have the test again. Overall, 88% of participants would recommend testing to others. This study has shown that in the absence of established preconceptional care services, preconceptional CF carrier screening is feasible, both in terms of practical achievements and target group accessibility.

## Further steps

A more extensive screening study is needed to answer the question whether implementation of preconceptional CF carrier screening on a larger scale is also possible in the Netherlands, and to find the best way of introducing a national programme for cystic fibrosis carrier screening. Moreover, preference has been given to placing pre-test counselling for CF carrier screening into a broader preconception care programme including information on risk factors in pregnancy (e.g. alcohol, smoking), and health promoting activities and discussing their family history.

The Health Council of the Netherlands has currently established a committee to advise the Minister of Health Welfare and Sports whether and how preconception care, including CF carrier screening, is desirable and feasible.

## References

- Boulton M, Cummings C, Williamson R. The views of general practitioners on community carrier screening for cystic fibrosis. *Br J Gen Pract* 1996;46:299-301.
- Conway SP, Allenby K, Pond MN. Patient and parental attitudes toward genetic screening and its implications at an adult cystic fibrosis centre. *Clin Genet* 1994;45:308-12.
- De Walle HE, Jong-van den Berg LT, Cornel MC. Periconceptional folic acid intake in the Northern Netherlands. *Lancet* 1999;353:1187.
- Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genet Med* 2001;3:149-54.
- Haddow JE, Bradley LA, Palomaki GE, Doherty RA, et al. Issues in implementing prenatal screening for cystic fibrosis: results of a working conference. *J Med Screen* 1999;6:60-6.
- Henneman L, Bramsen I, Van Os ThAM, Reuling IEW, Heyerman HGM, Van der Laag J, Van der Ploeg HM, Ten Kate LP. Attitudes towards reproductive issues and carrier testing among adult patients and parents of children with cystic fibrosis (CF). *Prenat Diagn* 2001;21:1-9.
- Henneman L, Bramsen I, van der Ploeg HM, ten Kate LP. Preconception cystic fibrosis carrier couple screening: impact, understanding, and satisfaction. *Genet Test* 2002;6:195-202.
- Henneman L, Bramsen I, van Kempen L, van Acker MB, Pals G, van der Horst HE, Ader HJ, van der Ploeg HM, ten Kate LP. Offering preconceptional cystic fibrosis carrier couple screening in the absence of established preconceptional care services. *Community Genet* 2003;6:5-13.
- Holloway S, Brock DJ. Cascade testing for the identification of carriers of cystic fibrosis. *J Med Screen* 1994;1:159-64.
- Poppelaars FAM, Henneman L, Ader HJ, Cornel MC, Hermens RP, van der Wal G, ten Kate LP. Preconceptional cystic fibrosis carrier screening: attitudes and intentions of the target population. *Genet Test*. 2004a;8:80-9.
- Poppelaars FA, Ader HJ, Cornel MC, Henneman L, Hermens RP, van der Wal G, ten Kate LP. Attitudes of potential providers toward preconceptional cystic fibrosis carrier screening. *J Genet Couns*. 2004b;13:31-44.
- Raeburn JA. Screening for carriers of cystic fibrosis. Screening before pregnancy is needed. *BMJ* 1994;309:1428-9.
- Watson EK, Williamson R, Chapple J. Attitudes to carrier screening for cystic fibrosis: a survey of health care professionals, relatives of sufferers and other members of the public. *Br J Gen Pract* 1991;41:237-40.
- Wildhagen MF, Ten Kate LP, Habbema JD. Screening for cystic fibrosis and its evaluation. *Br Med Bull* 1998;54:857-75.
- Williamson R. Universal community carrier screening for cystic fibrosis? *Nature Genetics* 1993;3:195-201.

## Traduzione Italiana

### Gli obiettivi dello screening dei portatori nella popolazione

*Per molte malattie autosomiche recessive, quale la fibrosi cistica (CF), è possibile cercare se una persona sia un portatore sano. Se entrambi i partners sono portatori, ogni bambino ha un rischio 1 su 4 di avere la fibrosi cistica. Lo screening di popolazione dei portatori è possibile poiché è disponibile un test affidabile ed esso merita una valorizzazione perché la fibrosi cistica è relativamente diffusa, è una malattia seria e porta ad una significativa morbilità ed anche a morte precoce. Inoltre, per le coppie di portatori identificate sono disponibili delle opzioni riproduttive.*

*La maggior parte dei portatori non sa che sono portatori, cosicché essi non sono consapevoli del*

*loro rischio e, nella maggior parte dei casi, la diagnosi di un bambino con CF rimane del tutto inattesa. Oltre l'80% dei pazienti nascono in famiglie che non hanno storie di CF, ed è stato pertanto suggerito che sia assicurato per la popolazione generale lo screening dei portatori CF (Williamson, 1993) inoltre, Holloway e Brock (1994) hanno dimostrato che solo l'8% - 24% di tutte le coppie di portatori sarebbero identificate se l'esame dei parenti di pazienti CF fosse ristretto al livello dei secondi cugini e dei parenti più stretti (cosiddetto "testing a cascata").*

*I programmi di screening di popolazione dei portatori orientati all'identificazione dello stato di portatore CF nelle coppie, prima della nascita o del concepimento di un bambino, rendono possibile informare queste coppie circa il loro rischio di avere un bambino con CF. L'intento dello screening dei*

portatori CF è quindi quello di offrire a queste coppie l'opportunità di renderle edotte in anticipo su questo aumentato rischio e di prendere quindi decisioni riproduttive informate. Le possibili opzioni riproduttive per coppie di portatori includono ad esempio: l'evitare una gravidanza, l'accettare il rischio di avere un bambino CF, la diagnosi prenatale e l'interruzione selettiva di gravidanza, o la preparazione per un bambino con CF. Benchè una delle conseguenze dello screening possa essere una riduzione nel numero di nascite di bambini con CF o una riduzione nei costi dell'assistenza, tali riduzioni non sono un obiettivo dello screening. Un programma di screening che risultasse in una forte riduzione nel numero di bambini nati con CF ma che non mettesse i partecipanti al programma in una condizione di prendere una decisione autonoma informata fallirebbe completamente.

## **Gruppi sui quali si può applicare lo screening dei portatori**

Nella maggior parte dei paesi lo screening di popolazione per il portatore CF non è incluso negli standard di assistenza medica e il dibattito si concentra infatti sulla questione se esso sia desiderabile, nonostante stia aumentando il sostegno allo screening. Lo screening del portatore può teoricamente avvenire in momenti differenti della vita. Possibili gruppi interessati sono le donne in gravidanza ed i loro partners (screening in gravidanza o pre-natale), individui o coppie prima della gravidanza (screening pre-concezionale), bambini in età scolare (screening scolare), e neonati (screening neo-natale). Ogni approccio ha i suoi pro e contro (Willdhagen ed altri, 1998). Lo screening dei portatori nei neonati o nei bambini in età scolare è generalmente non consigliabile a causa del lungo lasso di tempo che intercorre fino al momento in cui l'informazione diventa utile ed a causa del fatto che i soggetti testati non possono decidere da sé stessi se desiderano o no conoscere se essi sono portatori (Williamson ed al. 1993; Willdhagen ed al. 1998). Lo screening di tutti gli individui in età riproduttiva è improbabile che possa essere sistematico, poichè molte persone non considerano che sia rilevante un tale esame. Gli screening delle coppie in gravidanza o in fase

pre-concezionale sembrano essere le opzioni migliori per interessare i futuri genitori. Lo screening in gravidanza ha un vantaggio pratico in virtù delle facilitazioni oggi esistenti e, poichè la maggior parte delle donne in gravidanza contattano il loro medico generico o si fanno visitare negli ambulatori pre-natali, questo gruppo è facile da raggiungere. Uno svantaggio è che questo tipo di screening lascia limitate opzioni riproduttive nel caso che entrambi i partners siano portatori e può imporre un vincolo di tempo allorchè si debbono prendere decisioni circa la diagnosi prenatale. Lo screening pre-concezionale consente un numero massimo di opzioni riproduttive ed un minimo di vincoli di tempo (Raeburn ed al., 1994) ed è considerato in tutto il mondo essere la più appropriata strategia per lo screening del portatore CF. Tuttavia, uno svantaggio dello screening pre-concezionale è l'assenza, nella maggior parte dei paesi, di un sistema di consultazione pre-concezionale e pertanto deve essere messo in atto uno sforzo considerevole per raggiungere la popolazione interessata, cioè coloro che prendono in considerazione una gravidanza. Date le limitate risorse che sono disponibili per una assistenza pre-concezionale e stante che nella maggior parte dei paesi esiste già qualche infrastruttura prenatale, la maggior parte dei programmi di screening del portatore si orientano allo screening durante la gravidanza.

In Olanda, dove la percentuale delle gravidanze programmate è alta (85%) (Dewalle ed al. 1999), lo screening pre-concezionale sembra essere l'opzione più adatta. Lo screening pre-natale potrebbe essere usato come una "rete di salvataggio" per donne in gravidanza che non si sono occupate del problema in fase pre-concezionale.

## **Attitudini verso lo screening preconcezionale del portatore**

In generale, la popolazione target ha attitudini positive verso lo screening preconcezionale del portatore (Poppelaars et al, 2004a; Henneman et al, 2003). Alcuni studi hanno anche dimostrato che la maggior parte dei genitori di bambini con CF riportano che essi avrebbero desiderato conoscere anticipatamente il loro stato di rischio



(Henneman et al, 2001), e pertanto l'incremento nel numero di coppie di portatori identificate prospettivamente sembrerebbe auspicabile. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che la maggior parte dei pazienti CF e loro parenti hanno una positiva attitudine nei confronti di uno screening CF routinario nella popolazione (Conway et al, 1994; Watson et al, 1991).

Uno studio basato su questionario condotto presso 102 potenziali providers di screening (campione rappresentativo dei medici generici olandesi) ha mostrato che il 55% aveva una attitudine positiva nei confronti di uno screening offerto come routine, e più dell'80% era favorevole ad informare la popolazione target circa la possibilità di avere un test del portatore (Poppelaars et al, 2004b). Altri studi confermano questi risultati (Boulton et al, 1996; Watson et al, 1991).

## Considerazioni di ordine etico

Un importante criterio che viene applicato ai programmi di screening genetico è che essi dovrebbero essere presi in considerazione se gli aspetti di beneficio superano gli aspetti potenzialmente nocivi dello screening. L'introduzione di programmi di screening genetico dei portatori solleva parecchi problemi e preoccupazioni di ordine psicosociale, etico, legale ed economico. I possibili effetti avversi dello screening includono: l'ansia causata da informazioni che non possono essere usate per fare positive scelte personali; la stigmatizzazione sociale di alcuni individui che potrebbero rifiutare l'offerta di screening; cattivo uso dell'informazione e discriminazione basata sui risultati del test una volta che essi fossero rivelati a terzi, come ad assicuratori o datori di lavoro. Lo screening ha anche implicazioni per le famiglie, poiché esso non coinvolge soltanto il soggetto che intende essere testato ma anche altri membri della famiglia che non hanno acconsentito a farsi testare. L'identificazione del portatore ha anche sollevato la questione se l'opzione di interrompere una gravidanza affetta non tolga valore alla vita dei pazienti CF o non impedisca la ricerca di nuove cure (Haddow et al, 1999). Inoltre, sono stati sollevati problemi relativi alla grande variabilità clinica ed etnica della malattia, incluso il

prevedibile enorme carico che verrebbe imposto alle risorse per la consulenza genetica (Grody et al, 2001).

Uno dei principali problemi tecnici che si hanno con lo screening del portatore CF è che il test per identificare i portatori non è sensibile al 100%, poiché non tutte le mutazioni sono conosciute: nella maggior parte delle popolazioni di origine europea approssimativamente il 90-95% delle mutazioni CF può essere riconosciuto con i test correnti (In Italia e negli altri paesi mediterranei anche molto meno, ndr). Questo significa che per le coppie in cui una mutazione sia identificata in uno dei partners, mentre l'altro risultasse negativo al test, rimarrebbe ancora una certa probabilità che essi siano una coppia di portatori. Di conseguenza, queste cosiddette "coppie +/-" potrebbero entrare più in ansia dal momento che esse avranno un rischio residuo di avere un bambino con CF, mentre ad esse non potrebbero essere offerte chiare opzioni, quali la diagnosi prenatale. Una particolare attenzione deve essere posta a questa imperfetta sensibilità del test nella informazione e nella consulenza fornita quando viene offerto lo screening.

## Risultati di uno studio sullo screening preconcezionale

Lo screening preconcezionale del portatore CF è stato sottoposto a studio in una larga ricerca in Olanda, condotta tra il 1997 e il 2000 (Henneman et al, 2003). Oltre 38.000 persone, in età tra i 20 e i 35 anni, furono invitate per via postale, sia dai Servizi Municipali per la Salute (MHS) che dal loro medico generico (GP) a partecipare ad un programma di screening, assieme ai loro partners, nel caso che essi stessero programmando una gravidanza. Veniva fornita una consulenza pre-test sia durante una seduta in gruppo che in occasione di una consultazione con il loro medico curante. Tra quelli che ricevettero l'invito, il 20% avevano un partner con cui intendevano avere bambini. La partecipazione variava in base al tipo di consulenza pre-test: la consulenza con il medico curante produsse il più alto tasso di partecipazione (25%). Non vi fu invece influenza sul grado di partecipazione in rapporto all'origine delle lettere di

*invito, MSH o GP. 559 coppie (96%) acconsentirono di essere testate dopo la seduta di informazione. La principale ragione addotta per non aver risposto all'invito fu la "mancanza di tempo per partecipare" (48%). Assai poche coppie riferirono che esse avevano partecipato perché avevano la sensazione che non avrebbero potuto rifiutare. In totale il 69% dei non partecipanti e l'89% dei partecipanti credevano che lo screening avrebbe dovuto essere offerto a tutte le coppie che stavano pianificando una gravidanza.*

*Furono identificati 18 portatori CF; i loro partner risultarono negativi al test. Otto partecipanti riferirono di sentirsi preoccupati e 7 portatori riferirono, su richiesta specifica, che essi si sentivano meno sani (Henneman et al, 2002). Tuttavia i risultati dello studio suggeriscono che questi inconvenienti sono tollerabili, poiché gli stessi soggetti si sentirebbero di decidere ancora per il test. Complessivamente, l'88% dei partecipanti raccomanderebbero ad altre persone di farsi testare. Questo studio ha dimostrato che, in assenza di servizi istituzionali di assistenza preconcezionale, lo screening preconcezionale dei portatori CF è*

*fattibile, sia in termini di risultati pratici che di accessibilità al gruppo interessato.*

## **Ulteriori passi**

*E necessario uno studio più esteso per rispondere alla questione se l'implementazione di uno screening preconcezionale del portatore CF su larga scala sia possibile anche in Olanda e per trovare quale sia la modalità migliore per introdurre un programma nazionale per tale screening. Inoltre, è stata data preferenza a collocare la consulenza pre-test per lo screening del portatore CF in un più vasto programma di assistenza preconcezionale, che includa l'informazione sui fattori di rischio per la gravidanza (ad esempio, alcool, fumo, etc), attività mirate a promuovere lo stato di salute e discussione sulla storia familiare.*

*Il Consiglio per la Salute dell'Olanda ha attualmente costituito una commissione con lo scopo di fornire suggerimenti al Ministro della Salute e dello Sport sul se e come un'assistenza preconcezionale, che includa anche lo screening del portatore CF, sia desiderabile e fattibile.*

### Acquisizioni sulla macchina secretiva epiteliale e prospettive di terapia del difetto base CF

Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA



*Il Dr William Guggino è professore di Fisiologia e Pediatria presso la Johns Hopkins School of Medicine di Baltimora. Egli ha rivestito e riveste parecchi incarichi di direzione di ricerca, tra cui: Centro di Terapia Genica della Fibrosi Cistica presso l'NIH, Centro Specializzato di Ricerca per la Fibrosi Cistica sempre al NIH, vice direttore di Ricerche in Pediatria presso la J. Hopkins University School di Baltimora. Grande esperto nelle tecniche di biologia molecolare, i suoi interessi di ricerca più recenti riguardano: diagnosi, patogenesi e trattamento delle malattie genetiche nei bambini; ruolo della CFTR nello sviluppo dei polmoni e funzionamento dei canali del cloro; meccanismi di trasporto tubulare renale, con particolare interesse per le interazioni proteiche nella secrezione di fluidi; interazione tra proteina CFTR ed altre proteine nella maturazione e funzionamento di CFTR; nuovi approcci farmacologici per modificare l'espressione e la maturazione di CFTR; biologia molecolare della CF in generale; trial clinico con duramicina.*

CFTR, a Cl<sup>-</sup> channel that is regulated by phosphorylation and ATP hydrolysis, is localized at the apical membrane in secretory epithelia such as the conducting airways and in the apical and basolateral membrane of the sweat duct. CFTR mediates ion and water transport across the epithelial barrier 1. A number of ion channels work in concert with CFTR. These include outwardly rectifying chloride channels (ORCC), epithelial sodium channels (ENaC), and inwardly rectifying potassium channels (ROMK2) (see 2 for a review). CFTR is also functionally associated with signal transduction enzymes 1. The functional interaction of CFTR with other proteins suggests that CFTR may be physically associated with these proteins.

Ion channels in neuronal tissues are not diffusely distributed throughout the neurons but are rather localized and clustered at specialized subcellular site such as presynaptic and postsynaptic membranes. Scaffolding proteins that contain PDZ domains typically bind to the C-terminus of ion channels and organize them in three-dimension complexes at these locations 3. PDZ domain is a modular protein interaction domain consisting of 80-90 amino acids. It was originally identified in post-synaptic density protein PSD95, drosophila tumor suppressor Dlg and epithelial tight junction protein ZO-1 3. In addition to targeting channels and receptors to the specialized membrane, the action of scaffolding proteins organizes the related signaling molecules into macromolecular complexes. For example, the PDZ protein InaD localizes the transient receptor potential (TRP) channel to the rhabdomere, and assembles TRP into a functional protein complex with signal transduction molecules 4.

Many proteins participate in the processing of CFTR from the endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane and in organizing CFTR in the plasma membrane. The presentation will highlight the role of the PDZ domain proteins in regulating the trafficking and processing of CFTR and point to a role for this domain in secretory diarrhea and CF.

## References

1. Fuller, C. M. and D. J. Benos. 1992. CFTR. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 263:C267-C286.
2. Devidas, S. and W. B. Guggino. 1997. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and ATP. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9:547-552.
3. Sheng, M. and E. Kim. 1996. Ion channel associated proteins. *Curr.Opin.Neurobiol.* 6:602-608.
4. Montell, C. 1998. TRP trapped in fly signaling web. *Curr.Opin.Neurobiol.* 8:389-397.

## Traduzione Italiana

*La proteina CFTR, un canale del cloro che è regolato attraverso la fosforilazione e l'idrolisi di ATP, è localizzata sulla membrana apicale negli epitelii secretori quali le vie aeree e le membrane apicale e baso- laterale del condotto sudoriparo. La CFTR media il trasporto di ioni e di acqua attraverso la barriera epiteliale. Parecchi canali ionici lavorano di concerto con il canale CFTR. Questi includono i "canali di rettifica esterna del cloro" (ORCC), i "canali epiteliali del sodio" (ENaC), e i "canali di rettifica interna del potassio" (ROMK2) (vedere 2. per una rassegna sistematica). Il CFTR è anche funzionalmente associato con enzimi trasduttori di segnale (1). L'interazione funzionale di CFTR con altre proteine suggerisce che la CFTR può essere fisicamente associata con queste proteine.*

*I canali ionici nei tessuti neuronali non sono diffusamente distribuiti lungo i neuroni ma sono piuttosto localizzati e concentrati presso siti subcellulari specializzati quali le membrane pre-sinaptiche e post-sinaptiche. Le proteine di sostegno che contengono domini PDZ sono legate tipicamente al punto di testa c (C-terminus) dei canali ionici e li organizzano in complessi tridimensionali in queste sedi (3). Il dominio PDZ è un dominio di interazione proteica modulare*

*costituito di 80-90 aminoacidi. Esso fu originariamente identificato nella proteina di densità post-sinaptica PSD95, nel soppressore Dig del tumore della drosophila, e nella proteina ZO-1 delle "tight junction" epiteliali (3). Oltre ad interessante canali e recettori sulle membrane specializzate, l'azione delle proteine di sostegno organizza le relative molecole di segnale in complessi macro-molecolari. Per esempio, la proteina PDZ InaD localizza il canale recettore transitorio di potenziale (TRP) a livello di raddomero, e assembla il TRP in un complesso proteico funzionale con molecole di trasduzione di segnale (4).*

*Molte proteine partecipano all'elaborazione della proteina CFTR a livello del reticolo endoplasmico, per farla pervenire sulla membrana plasmatica, ed all'organizzazione della CFTR stessa su tale membrana.*

*La presentazione in questo seminario illustrerà il ruolo delle proteine del dominio PDZ nel regolare il movimento e la maturazione di CFTR e focalizzerà il ruolo di questo dominio nella diarrea secretiva e nella fibrosi cistica, con possibili implicazioni per lo sviluppo di possibili strategie terapeutiche.*



## Terapia della Fibrosi Cistica basata su cellule staminali

### Cystic fibrosis (CF)

CF is the most prevalent, fatal genetic disorder in the Caucasian population, affecting 1 in ~2,500 live births each year. Although CF affects multiple epithelia-lined organs, the most severe and life-threatening pathology occurs in the lung. The primary physiological defect in the CF lung has been identified as an abnormality in cAMP-mediated transepithelial Cl<sup>-</sup> transport and osmotically coupled fluid transport. Clinical manifestations include abnormally viscous mucus, poor mucociliary clearance, chronic bacterial infections, bronchiectasis and, eventually, pulmonary failure leading to death. Studies have linked the CFTR gene defect to alterations in airway defenses and mucociliary clearance. Because of the inability to eradicate infections, bacteria colonize airways, establishing a persistent infection. The large number of neutrophils recruited to the lung release elastase and other factors causing severe airway damage. Current therapeutic approaches include a combination of postural drainage, chest percussion with antibiotics and bronchodilators, inhaling recombinant DNase, and anti-inflammatory agents. Several new approaches are under testing, such as antiproteases, mucolytic agents, and drugs for correction of sodium transport abnormalities. Although these approaches treat the symptoms, none represent a cure for the CF respiratory manifestations.

### Gene Therapy for CF and the encountered problems

Since the isolation of the CFTR gene in 1989, introduction of a functional CFTR gene into CF airway epithelia has been thought to provide the most direct cure for CF lung disease. Adenovirus vectors were first exploited to test the hypothesis based on the fact that adenovirus is a common respiratory virus in clinics. It was hoped that adenovirus-

*Department of Medicine and Genetics, Gene Therapy program, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, USA*

*Il Dr Guoshun Wang, con lauree in biologia cellulare e molecolare e in medicina veterinaria, insegna medicina molecolare presso il dipartimento di Medicina e Genetica dell'Università di Louisiana a New Orleans. E' stato ricercatore presso il dipartimento di Pediatria nell'Università di Iowa. E' ora attivo nel Programma di Terapia Genica presso l'Università di Louisiana. I suoi interessi di ricerca sono rivolti soprattutto alle terapie di trasferimento genico con vettori virali. Oggi è largamente impegnato nello studiare le potenzialità di terapia della fibrosi cistica mediante cellule staminali trattate con correzione genica.*



derived vectors would transduce lung epithelia with high efficiencies. Nine clinical trials using such vectors have been published. All the data demonstrated a low efficiency of gene delivery and high inflammatory responses. Adeno-associated vectors and non-viral liposomes have also been tested in CF patients, demonstrating a disappointing efficacy as well. None of the clinical trials demonstrated any alteration of sodium hyperabsorption associated with CF. The pulmonary epithelium has evolved to prevent the invasion of the host by microbes and the same strategies act as barriers impeding efficient gene delivery. The barriers include mucus, lack of receptors, DNA degradation, inefficient nuclear import, lack of vector integration, and inability to target stem cells. Given these formidable obstacles to vector-based gene delivery, other alternative approaches need to be explored and developed. Using adult stem cells for CF therapy represents a novel strategy, which may overcome the aforementioned barriers.

## **Marrow stem cells**

Stem cells are special populations of cells that are pluripotent and have the capacity for self-renewal. Bone marrow contains at least two types of stem cells: hematopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs). HSCs traditionally differentiate into blood lineages. They have also shown surprising plasticity to differentiate into epithelial cells of the liver, gut, lung, and skin (Krause et al., 2001; Jiang et al., 2002). MSCs traditionally differentiate into osteoblasts, chondroblasts, adipocytes and hematopoietic supporting stroma. Recent reports suggest that MSCs can also differentiate into nonstromal tissues (Prockop et al., 2003). Even though stem cell research is still at the early stage of development, promising results have been reported with the use of HSCs and MSCs in a number of animal models for human diseases.

## **Molecular base for adult stem cell differentiation**

All cells in one individual come from a single fertilized egg. Therefore, cells comprising various tissues or organs have identical genetic information. Different differentiation statuses are determined

by transcriptional and translational programs, which are predominantly affected by micro-environments. This speculation has been proved true by Dolly sheep's birth (Wilmut et al., 1997). The success of cloning animals suggests that cell differentiation does not involve any irreversible genetic modification. Therefore, adult stem cells should be able to induce to differentiate into tissues distinct from those naturally predetermined, if suitable conditions are provided. Besides differentiation or transdifferentiation, other mechanisms like cell fusion have been reported, which are still beneficial therapeutically as long as functional phenotype occurs.

## **The general appeal of mesenchymal stem cells (MSCs) and the potential for CF application**

My laboratory is focusing on mesenchymal stem cells for CF therapy. I would like to discuss MSCs into some more details. MSCs have attracted increasing attention for their potential use in cell-based therapy because they have several appealing features (for reviews, see Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999): (a) they are readily isolated from a patient by simple bone marrow aspiration under local anesthesia. (b) They can be readily expanded in culture up to a billion fold in 8 weeks. (c) Although the cells can be expanded rapidly, they are not immortal. Therefore they do not pose any danger of producing tumors, as seen with embryonic stem cells and with most immortal cell lines; (c) MSCs can differentiate ex vivo and in vivo into multiple cell lineages, including osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, myocytes, pneumocytes, epithelial cells, and early neural precursors; (e) They can be readily transduced with genes with the use of viral and nonviral vectors; (f) The cells have the remarkable property that they home to sites of tissue injury and repair the tissue either by differentiating into tissue-specific cell phenotypes or by creating a milieu that increases the capacity of the endogenous cells to repair the tissue.

In an early study of MSC transplantation and engraftment, Pereira and colleagues (1998) injected collagen-I modified MSCs into the tail vein of sublethally irradiated mice and determined that

MSCs could be localized to the lung, bone, and cartilage for as long as five months post-transplant. Jiang et al. (2002) demonstrated that adult MSCs differentiate into all three germ layers and tissue-specific cell types including airway epithelium, when injected into an early blastocyst. It has also been documented that adult mouse MSCs differentiated into type I pneumocytes in bleomycin injured lungs (Kotton et al. 2001). In a more recent study, Ortiz and colleagues demonstrated that MSCs traffic to the lung in response to injury with bleomycin, adopt an epithelium cell-like morphology, and promote the reduction of bleomycin-induced inflammation and collagen deposition (Ortiz et al., 2003). Recently, human MSCs have identified to differentiate into cells that morphologically resemble airway epithelial cells and to express epithelial-specific genes as they differentiate (Spees et al., 2003). In a different setting, Grove et al (2002) transplanted retrovirus-transduced bone marrow stem cells into sublethally irradiated mice. They found that the donor stem cells repopulated in the lung and differentiated into lung epithelium. These results suggest the pluripotency of mesenchymal stem cells, indicating that adult MSCs have the potential for therapy of lung diseases.

In my laboratory, we tested the hypothesis that MSCs from CF patients can be isolated, expanded and gene-corrected, and the gene-corrected CF-MSCs have the ability to correct the CF-associated Cl<sup>-</sup> secretion defect by functionally transporting this anion to the apical side (Wang et al., 2005). We first co-cultured human MSCs with primary human airway epithelial cells at the air-liquid interface. Expression of epithelia-specific genes, such as

cytokeratin 18 and occludin, was induced, suggesting that under such a co-culture condition, MSCs differentiated into epithelium. Furthermore, we isolated MSCs from several CF patients. The CF-MSCs were amenable to CFTR gene correction. The CFTR-corrected CF-MSCs still retain their potential of differentiating into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. Importantly, the gene-corrected CF-MSCs can contribute to the apical chloride secretion in response to cAMP stimulation. These in vitro results proved the principle of using MSCs for the treatment of CF.

## Stem cell for CF therapy: challenges and future perspectives

Even though the in vitro results look promising and marrow stem cells have the potential, this approach is still at the very early research stage. Three major issues would have to be resolved before any clinical trial attempts: 1) how to efficiently recruit CFTR-gene-corrected stem cells to the lung? 2) how to efficiently induce the gene-corrected stem cells to differentiate into lung epithelial cells to achieve therapeutic effects in vivo? 3) how to safely gene-correct stem cells from CF patients? Basic research on stem cell biology and stem cell engineering is critical to improve our understanding of the underlying cellular mechanisms for stem cell differentiation and to achieve directional stem cell homing and engraftment to CF lungs. Methods to functionally test stem cell differentiation in CF lungs need to be developed. A suitable animal model is also needed to test the stem cell-based approach.

## References

- Grove, J. E. et al. Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27, 645-51 (2002).
- Jiang, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-9 (2002).
- Kotton, D. N. et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 128, 5181-8 (2001).
- Krause, D. S. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-77 (2001).
- Ortiz, L. A. et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8407-11 (2003).
- Pereira, R. F. et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1142-7 (1998).
- Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-7 (1999).

- Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-4 (1997).
- Prockop, D. J., Gregory, C. A. & Spees, J. L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11917-23 (2003).
- Spees, J. L. et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2397-402 (2003).
- Wang, G. et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 186-91 (2005).
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1997 Mar 13;386(6621):200]. *Nature* **385**, 810-3 (1997).

## Traduzione Italiana

### La fibrosi cistica (CF)

*La fibrosi cistica è la più diffusa malattia genetica a prognosi grave nella popolazione caucasica: essa colpisce circa 1 su 2500 nati vivi ogni anno. Benché la CF interessi molteplici organi rivestiti da epitelio, la patologia più grave e che compromette la vita riguarda i polmoni. Il difetto fisiologico primario nel polmone è stato identificato in una anomalia del trasporto transepiteliale di ione cloro, mediato da AMP ciclico, e di trasporto, ad esso osmoticamente accoppiato, di fluidi. Le manifestazioni cliniche comprendono un muco abnormemente viscoso, una ridotta clearance mucociliare (detersione delle vie aeree, ndr), infezioni batteriche croniche, bronchiectasie e con il tempo insufficienza respiratoria. La ricerca ha legato il difetto del gene CFTR alle alterazioni delle difese e della clearance mucociliare. A causa della inettitudine dell'organismo ad eradicare le infezioni, i batteri colonizzano le vie aeree, stabilendo così una infezione persistente. Il grande numero di globuli bianchi neutrofili reclutati nel polmone libera elastasi ed altri fattori che causano un grave danno alle vie aeree. Gli attuali approcci terapeutici includono una combinazione di fisioterapia respiratoria, antibiotici e broncodilatatori, DNasi per via inalatoria, e agenti antinfiammatori. Alcuni nuovi approcci sono in corso di sperimentazione, come le antiproteasi, alcuni agenti mucolitici, e farmaci per la correzione delle anomalie di trasporto del sodio. Benché queste terapie siano in grado di curare i sintomi, nessuna di esse rappresenta una terapia radicale per le manifestazioni respiratorie.*

### La terapia genica della fibrosi cistica e i problemi incontrati

*Da quando fu isolato il gene CFTR nel 1989, si è pensato che l'introduzione di un gene CFTR funzionante negli epitelii delle vie aeree CF potesse fornire la cura radicale più diretta per la malattia polmonare CF. Furono utilizzati dapprima come vettori del gene gli Adenovirus, con l'intento di testare l'ipotesi basata sul fatto che l'adenovirus è un comune virus respiratorio di interesse clinico. Si sperò che i vettori derivati dall'adenovirus avrebbero trasferito il gene agli epitelii polmonari con grande efficienza. Sono stati pubblicati 9 studi clinici basati sull'impiego di tali vettori. Tutti i dati hanno dimostrato una bassa efficienza nella capacità di trasferire il gene nonché risposte infiammatorie come effetto collaterale. Sono stati testati in pazienti CF anche virus adeno-associati e vettori liposomici ma essi hanno mostrato la stessa deludente efficacia. Nessuno degli studi clinici ha dimostrato alcuna modifica dell'eccesso di assorbimento di sodio tipicamente associato a CF. L'epitelio polmonare si evolve in maniera tale da prevenire l'invasione dell'ospite da parte dei microbi ed esso mette in atto le stesse strategie difensive offrendo barriere per impedire un efficiente trasferimento del gene. Tali barriere includono: il muco, la mancanza di recettori, la degradazione del DNA, l'inefficiente importazione del DNA genico nel nucleo, la mancanza di integrazione del vettore con il genoma dell'ospite nonché la inettitudine ad interessare le cellule staminali. Stanti questi formidabili ostacoli nei confronti del trasferimento di gene basato sui vettori, necessita esplorare e sviluppare approcci alternativi.*

*L'uso di cellule staminali adulte per la terapia della fibrosi cistica rappresenta una strategia innovativa che potrebbe superare le barriere sopra menzionate.*

## **Le cellule staminali midollari**

*Le cellule staminali sono una speciale popolazione di cellule che sono pluripotenti ed hanno la capacità di autorinnovarsi. Il midollo osseo contiene almeno due tipi di cellule staminali: le cellule staminali ematopoietiche (HSCs,) e le cellule staminali mesenchimali (MSCs,). Le cellule ematopoietiche si differenziano in linee cellulari del sangue. Esse hanno peraltro dimostrato una sorprendente plasticità, nel senso di essere in grado di differenziarsi anche in cellule epiteliali del fegato, dell'intestino, dei polmoni e della pelle (Krause et al, 2001; Jiang et al, 2002). Le staminali mesenchimali abitualmente si differenziano in osteoblasti (cellule dell'osso), condroblasti (cellule della cartilagine) adipociti (cellule di deposito di grasso) e cellule dello stroma ematopoietico (tessuto di sostegno del midollo). Segnalazioni recenti suggeriscono che le staminali mesenchimali possono anche differenziarsi in cellule di tessuti non stromali (Prockop et al, 2003). Benché la ricerca sulle cellule staminali sia ancora al suo primo stadio di sviluppo, sono stati riportati risultati promettenti con l'uso di cellule staminali sia ematopoietiche che mesenchimali in un certo numero di modelli animali per le malattie umane.*

## **Basi molecolari per la differenziazione di cellule staminali adulte**

*Tutte le cellule di un individuo derivano da una singola cellula uovo fecondata. Pertanto, le cellule che formano i vari tessuti ed organi hanno l'identica informazione genetica. Le diversità nei livelli e tipi di differenziazione sono determinate da cosiddetti programmi di trascrizione (il passaggio dell'informazione da DNA a mRNA, ndr) e di translazione (dall'RNA alla sintesi della proteina, ndr), che sono in maniera preponderante influenzati dai micro-ambienti (tessuti e organi diversi, ndr). Questa speculazione è stato provato essere vera con la nascita della pecora Dolly (Wilmut et*

*al, 1997). Il successo ottenuto nella clonazione di animali suggerisce che la differenziazione cellulare non comporta alcuna modificazione genetica irreversibile. Pertanto, le cellule staminali adulte dovrebbero essere in grado di venire indotte a differenziarsi in tessuti distinti da quelli naturalmente predeterminati, se si provvede a stabilire determinate condizioni. Accanto alla differenziazione o transdifferenziazione, sono stati riportati altri meccanismi, come la fusione cellulare, che conservano un potenziale benefico terapeutico per tutto il tempo in cui il fenotipo funzionale è in gioco.*

## **La generale attrazione per le cellule staminali mesenchimali (MSCs) e le potenziali applicazioni nella fibrosi cistica**

*Nel mio laboratorio ci si sta focalizzando sulle cellule staminali mesenchimali per la terapia CF. Mi piacerebbe discutere di queste cellule con qualche ulteriore dettaglio. Le MSCs hanno attirato in misura crescente l'attenzione per il loro potenziale impiego nella terapia cellulare perché esse hanno alcune caratteristiche attraenti (per alcune rassegne vedere Prockop, 1997; Pittenger et al, 1999). (a) Esse vengono facilmente isolate da un paziente per mezzo di una semplice aspirazione di midollo osseo in anestesia locale. (b) Esse possono essere facilmente moltiplicate in coltura fino a un miliardo di volte in 8 settimane. (c) Benché le cellule possano moltiplicarsi rapidamente, esse peraltro non sono immortali. Pertanto, esse non presentano alcun rischio di produrre tumori, come si è visto invece con le cellule staminali di origine embrionale e con la maggior parte delle linee cellulari immortalizzate. (d) Le MSCs possono differenziarsi ex vivo e in vivo in molteplici linee cellulari, inclusi osteoblasti, condrociti, adipociti, miociti, pneumociti, cellule epiteliali e primi precursori neurali. (e) Esse possono essere agevolmente trasdotte (trattate con materiale genico, ndr) mediante l'impiego di vettori virali e non virali. (f) Tali cellule hanno la rilevante proprietà di prendere posto su siti di danno tissutale e di riparare il tessuto sia differenziandosi in cellule con il fenotipo specifico di quel tessuto oppure creando un ambiente che aumenti la capacità delle cellule originarie a riparare il tessuto.*

*In uno studio preliminare di trapianto e innesto, Pereira e coll. (1998) iniettarono cellule staminali mesenchimali modificate in cellule del collagene-1 in una vena della coda di un topo irradiato in misura subletale, stabilendo che le MSCs potevano essere localizzate a livello di polmoni, osso e cartilagine per un periodo di almeno 5 mesi dopo il trapianto. Jiang e coll. (2002) dimostrarono che le MSCs adulte sono capaci di differenziarsi in tutti e tre i tipi di foglietti germinali (ectoderma, mesoderma, endoderma, ndr) e in vari tipi di cellule tessuto-specifiche, tra cui cellule epiteliali delle vie aeree, quando iniettate in una blastocisti (stadio precoce di sviluppo dell'embrione nella fase cosiddetta di blastula, ndr). E' stato anche documentato che le MSCs di un topo adulto si differenziano in pneumociti di tipo I (particolari cellule degli alveoli polmonari, ndr) quando siano state danneggiate da bleomicina (Kotton et al, 2001). In uno studio più recente, Ortiz e coll. dimostrarono che il movimento di MSCs verso il polmone, in risposta ad un danno provocato con bleomicina, adotta una morfologia di tipo epiteliale e promuove la riduzione dell'infiammazione e della deposizione di collagene indotta da bleomicina (Ortiz et al, 2003). Recentemente, si è visto che MSCs umane si differenziano in cellule che morfologicamente assomigliano a cellule epiteliali delle vie aeree ed esprimono geni epitelio-specifici mano a mano che esse si differenziano (Spees et al, 2003). In un ambiente diverso, Grove e coll. (2002) trapiantarono cellule staminali midollari trasdotte mediante retrovirus in topi irradiati in misura subletale. Essi trovarono che le cellule staminali del donatore ripopolavano il polmone e si differenziavano in cellule dell'epitelio polmonare. Questi risultati suggeriscono la pluripotenzialità delle cellule staminali mesenchimali, indicando che le MSCs adulte hanno il potenziale per una terapia di malattie polmonari.*

*Nel mio laboratorio noi abbiamo testato l'ipotesi che cellule staminali mesenchimali di pazienti CF possano essere isolate, moltiplicate e corrette geneticamente e che le MSCs di origine CF corrette per il gene CFTR abbiano l'attitudine a correggere il difetto di secrezione del cloro associato a CF mediante il trasporto di questo anione a livello dell'apice cellulare (Wang et al, 2005). Dapprima*

*noi abbiamo coltivato insieme MSCs umane e cellule epiteliali umane primarie delle vie aeree a livello di una interfaccia aria-liquido. Fu indotta quindi l'espressione di geni specifici dell'epitelio, quali i geni della cheratina 18 e dell'occludina, ricavandone l'indicazione che in tali condizioni di coltura le MSCs si differenziavano in epitelio. Inoltre, isolammo MSCs da alcuni pazienti CF. Le cellule staminali mesenchimali CF venivano quindi sottoposte a correzione del gene CFTR. Le cellule staminali CF corrette per il gene CFTR conservavano ancora il loro potenziale di differenziarsi in osteoblasti, adipociti e condrociti. E soprattutto importante, le MSCs CF geneticamente corrette potevano contribuire alla secrezione di cloro in risposta alla stimolazione con AMP ciclico. Questi risultati ottenuti in vitro provavano il principio che si potevano usare MSCs per il trattamento della fibrosi cistica.*

## **Le cellule staminali per la terapia CF: sfide e prospettive future**

*Benché i risultati in vitro si siano mostrati promettenti e le cellule staminali midollari abbiano un sicuro potenziale terapeutico, questo approccio è ancora ad uno stadio di ricerca molto iniziale. Tre punti fondamentali dovrebbero essere risolti prima di ogni tentativo di studio clinico: 1) come convogliare efficientemente al polmone cellule staminali corrette per il gene CFTR? 2) come indurre efficientemente le cellule staminali geneticamente corrette a differenziarsi in cellule epiteliali per raggiungere effetti terapeutici in vivo? 3) come correggere geneticamente con sicurezza per il paziente cellule staminali provenienti da pazienti CF?*

*La ricerca di base sulla biologia delle cellule staminali e l'ingegneria genetica delle cellule staminali sono cruciali per migliorare le nostre conoscenze sul meccanismo cellulare che sta alla base della differenziazione delle cellule staminali e per ottenere l'orientamento delle cellule staminali a collocarsi e a trapiantarsi a livello del polmone. Necessita sviluppare metodi per testare funzionalmente la differenziazione di cellule staminali nel polmone. È necessario anche ottenere un modello animale adeguato per testare l'approccio terapeutico basato sulle cellule staminali.*





### Commento alla recente pubblicazione di G. Wang et Al. su cellule staminali e Fibrosi Cistica

*Professore di Medicina di Laboratorio all'Università di California e Scienziato Senior al California Pacific Medical Center, San Francisco, USA*

*Riteniamo utile riportare un commento alla recente pubblicazione di G Wang et al.(Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:181-91), redatto per noi dal prof. Dieter Gruenert, che su questa tematica già fece un autorevole intervento nella II Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani CF a Verona il 20 novembre 2004.*

The recent developments in stem cell research have opened a new arena for potential therapies and organ regeneration. The findings indicating the pluripotent capacity not only of embryonic stems (ES) cells, but also of bone marrow derived stem cells (BMSC) is a breakthrough in our understanding of the nature of stem cells and their origins (1-5). The finding that BMSC, in particular the marrow stromal stem cells (SMC) component of the BMSC, are able to engraft in various organs and transdifferentiate into cells that comprise the organ of engraftment and has clear implications for the repair of organ damage notably in the lungs(6-8). It is not a significant leap in imagination to see that these cells might also be effective for the repair of organs damaged as a result of an inherited disease. In a recent paper by Wang et al., published in the Proceedings of the National Academy of Science, USA (9), the authors elegantly demonstrate the pluripotent nature of MSC by showing that a portion of the MSC take on the characteristics of the airway epithelial cells with

which they are co-cultured. Since these airway epithelial cells are directly relevant to cystic fibrosis (CF) and are the primary site of the pathology associated with CF morbidity and mortality, MSC-mediated repair of CF-associate airway damage may have therapeutic value.

The authors first showed that MSC from human subjects differentiate into cells that display morphological and antigenic characteristics of airway epithelial cells when they mixed with immortalized CF airway epithelial cells and grown with an air-liquid interface to potentiate the differentiation of the epithelial cells. A proportion of the MSC showed a cuboidal, epithelial-like morphology and expressed a Green Fluorescent Protein (GFP) marker gene introduced into the MSC to distinguish them from cultured airway epithelial cells. The GFP-expressing MSC-derived columnar cells also showed the presence of the airway epithelial-specific cytokeratin-18 (CK-18). When the MSC were mixed with primary airway epithelial cells and

grown with an air-liquid interface, they showed the presence of occludin (a tight junction protein); as many as 10% of the MSCs in the population were occludin positive. In addition, the MSCs co-cultured with the airway epithelial cells and showed occludin expression, were also positive for CFTR expression. The MSC grown under normal culture conditions, i.e. submerged, showed only a typical MSC fibroblastic-type morphology with no keratin, occludin, or CFTR expression.

When evaluating the potential for wild-type CFTR complemented MSCs from CF patients to correct the cAMP-dependent Cl transport defect associated with CF, the authors observe an increase in the IBMX and forskolin stimulated Cl efflux. In these experiments, the CF MSCs carrying a wild-type CFTR were co-cultured with the immortalized CF airway epithelial cells. To obtain the complemented MSCs, the authors took MSCs isolated from a CF patient and complemented the defective CFTR with wild-type CFTR contained in a Moloney murine leukemia virus expression vector. The complemented CF-MSCs were then mixed at various ratios with the immortalized CF airway epithelial cells. An increase in the IBMX/forskolin induced current was observed at all co-culture ratios of wild-type CFTR complemented MSC/CF airway epithelial cell (5%, 10%, 20% MSC). The authors also detected an increase in IBMX/forskolin current when the CF MSCs in the co-culture were not complemented with wild-type CFTR. This may, in part, be due to secondary effects of the high concentrations of IBMX and forskolin used to stimulate cAMP-dependent Cl efflux of the cells. Because of the way the Cl efflux assay was carried out, changes in the "intactness" (i.e., the tight junction integrity) of the cell monolayer could result in the perception that there was an increase in transmembrane transport of Cl. Using this assay, one cannot exclude the possibility that the Cl might be transverse the monolayer by an extracellular pathway due to leaky tight junctions. Alternatively, it is also known that high concentrations of both IBMX and forskolin will stimulate other Cl transport pathways. One or several of these alternative Cl transport pathways might also be activated. The Cl efflux assay is difficult to perform using an air-liquid interface culture system and this measurement

of Cl ion transport in the co culture system will need further study. However, there does appear to be a greater increase in cAMP-dependent Cl efflux in the co-cultures containing CF MSCs complemented with wild-type CFTR when compared to co-cultures where the CF-MSC expressed only the native, mutant CFTR. The observation that the cells show very little fusion is also significant in that it appears as if there are conditions under which fusion can be minimized. Furthermore, the significance of fusion as applied to stem cell therapy has still not been clarified, and the degree of cell fusion (if any) that can undermine the therapeutic potential of stem cells will require elaboration.

The authors demonstrate that there are cell-cell interactions that can influence the differentiated state of adjoining cells. While not every MSC will transdifferentiate, there appear to be significant numbers of the MSCs that will become cells of the type surrounding them. This may, in part, be due to the pluripotency of the individual MSCs and the extent to which an MSC has committed along a particular differentiated pathway. In this study, the authors also provide some insight into the potential of CF MSCs expressing wild-type CFTR to correct the ion transport defect associated with CF. These investigations will require further study and will be strengthened by Ussing chamber analysis measuring transepithelial ion transport, especially given that the co-cultures show significant transepithelial resistance.

There are still numerous questions that will need to be answered before such a therapy can become viable. Most notable is the engraftment potential of MSCs in the airways of CF patients. In addition, the "homing" of the MSCs to specific organ destinations will need to be elucidated. In the case of CF it will also be important to determine whether it will be sufficient to correct the airway epithelium since there also appears to be an immune cell component involved in the progression of the disease. While this study is a first step in the evaluation of the therapeutic potential of MSCs for CF, the authors provide data indicating a possible role for MSCs in the treatment of CF and provide insight into factors that may be important in potentiating transdifferentiation.

## References

1. Hadjantonakis, A., and V. Papaioannou. 2001. The stem cells of early embryos. *Differentiation* 68(4-5):159-66.
2. Wagers, A. J., J. L. Christensen, and I. L. Weissman. 2002. Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther* 9(10):606-12.
3. Prockop, D. J. 2003. Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *J Cell Biol* 160(6):807-9.
4. Grove, J. E., E. Bruscia, and D. S. Krause. 2004. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22(4):487-500.
5. Krause, D. S. 2002. BM-derived stem cells for the treatment of nonhematopoietic diseases. *Cytotherapy* 4(6):503-6.
6. Kotton, D. N., B. Y. Ma, W. V. Cardoso, E. A. Sanderson, R. S. Summer, M. C. Williams, and A. Fine. 2001. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 128(24):5181-8.
7. Krause, D. S., N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel, and S. J. Sharkis. 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105(3):369-77.
8. Pereira, R. F., K. W. Halford, M. D. O'Hara, D. B. Leeper, B. P. Sokolov, M. D. Pollard, O. Bagasra, and D. J. Prockop. 1995. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11):4857-61.
9. Wang, G., B. A. Bunnell, R. G. Painter, B. C. Quiniones, S. Tom, N. A. Lanson, Jr., J. L. Spees, D. Bertucci, A. Peister, D. J. Weiss, V. G. Valentine, D. J. Prockop, and J. K. Kolls. 2005. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(1):186-91.

## Traduzione Italiana

*I recenti sviluppi nella ricerca sulle cellule staminali hanno aperto una nuova arena per potenziali terapie e rigenerazione di organi. I dati che indicano la capacità pluripotente non solo delle cellule staminali embrionali (derivate da embrioni), ma anche di quelle derivate dal midollo osseo sono un passo significativo nella nostra comprensione della natura di queste cellule e della loro origine (1 – 5). Il dato che le cellule staminali midollari, in particolare quelle dello stroma o mesenchima midollare (stroma o mesenchima è il tessuto connettivo entro cui stanno le cellule progenitrici di globuli rossi, globuli bianchi e piastrine del sangue, ndr), siano in grado di trapiantarsi in vari organi e di differenziarsi in cellule che compongono l'organo che riceve il trapianto ha chiare implicazioni per la riparazione del danno di quell'organo, incluso il polmone (6 – 8). Non è difficile immaginare che queste cellule possano essere efficaci anche per la riparazione di organi danneggiati a causa di una malattia ereditaria.*

*In un lavoro recente, pubblicato da Wang e collaboratori nella rivista Proceedings of the National Academy of Sciences USA (9), gli autori dimostrano elegantemente la natura pluripotente delle cellule staminali midollari, evidenziando che una porzione*

*di esse assumono le caratteristiche delle cellule epiteliali delle vie aeree con cui esse vengono assieme coltivate. Poiché queste cellule epiteliali sono direttamente rilevanti per la fibrosi cistica e sono il sito primario della patologia associata con l'elevata morbilità e mortalità della malattia, la riparazione del danno delle vie aeree per mezzo di cellule staminali potrebbe avere un valore terapeutico.*

*Per prima cosa gli autori hanno dimostrato che le cellule staminali midollari prelevate da soggetti umani si differenziavano in cellule che mostravano le stesse caratteristiche morfologiche e antigeniche delle cellule epiteliali delle vie aeree quando essi le coltivavano insieme con cellule epiteliali delle vie aeree CF rese immortali e le facevano crescere in un ambiente di liquido ed aria per stimolare la differenziazione delle cellule staminali. Una quota di cellule staminali mostravano una morfologia cuboidale, simil-epiteliale, ed esprimevano un particolare gene (GFP) che essi avevano introdotto nelle cellule staminali per riconoscerle e distinguerle da quelle delle vie aeree coltivate. Le cellule epiteliali derivate così dalle cellule staminali mostravano anche la presenza di una proteina, detta citocheratina -18, specifica dell'epitelio respiratorio. Quando le cellule staminali erano fatte crescere assieme a cellule epiteliali respiratorie*

*in un ambiente di aria e liquido, esse mostravano anche la presenza di un'altra proteina, chiamata "occludina", che è la proteina che costituisce i ponti che legano tra loro le cellule dell'epitelio respiratorio: almeno il 10% delle cellule staminali erano positive per la presenza di occludina. Inoltre, le cellule staminali coltivate assieme alle cellule epiteliali delle vie aeree e caratterizzate dalla presenza di occludina erano anche positive per la presenza di proteina CFTR (la proteina mancante o difettosa nella fibrosi cistica, ndr). Le cellule staminali fatte crescere in condizioni normali di cultura, cioè immerse nel liquido di cultura, mostravano solamente la tipica morfologia dei fibroblasti (cioè delle cellule del tessuto connettivo di cui le cellule staminali mesenchimali sono abitualmente le progenitrici, ndr), senza la presenza di cheratina, occludina e CFTR.*

*Si è poi valutata la potenzialità di correggere il difetto di trasporto di cloro, caratteristico della fibrosi cistica, da parte di cellule staminali differenziate provenienti da pazienti CF, nelle quali si era indotta la sintesi di proteina CFTR normale: effettivamente in queste cellule si è riuscito ad ottenere un incremento di flusso di cloro in seguito ad opportuna stimolazione. In questi esperimenti, le cellule staminali CF che portavano la proteina CFTR normale erano coltivate insieme a cellule respiratorie CF immortalizzate. Per ottenere le cellule staminali CF "complementate" da una CFTR normale sono state prese cellule staminali isolate da un paziente CF ed in queste si è indotta la produzione di CFTR normale con un trattamento di terapia genica per mezzo di un vettore virale (un virus della leucemia dei topi) recante nel suo contesto il gene CFTR normale. Un certo incremento di flusso di cloro è stato ottenuto anche in esperimenti con cellule staminali differenziate ma non trattate per la CFTR normale, ma questo può essere dovuto a stimolazione di canali del cloro diversi dal CFTR. Ma certamente il flusso di cloro era assai più elevato nelle cellule "normalizzate" per la*

*CFTR rispetto alle altre. È anche interessante osservare che, nelle condizioni di esperimento attuate, la fusione tra cellule, che potrebbe minare l'efficacia terapeutica potenziale delle cellule staminali, era ridotta al minimo.*

*Lo studio ha anche dimostrato che ci sono interazioni tra le cellule, che possono influenzare lo stato di differenziazione di cellule contigue. Mentre non tutte le cellule staminali si differenziano in cellule respiratorie, appare tuttavia esservi un numero significativo di cellule staminali che diventano cellule del tipo di quelle che le circondano. Questo può essere in parte dovuto alla pluripotenzialità della singola cellula staminale e al grado raggiunto di un suo particolare percorso di differenziazione. In questo studio, gli Autori forniscono anche alcuni approfondimenti sulla potenzialità delle cellule staminali che esprimono la CFTR normale nel correggere il difetto di trasporto ionico associato con la fibrosi cistica, ma questo richiede ulteriori studi condotti anche con tecniche alternative.*

*Ci sono ancora numerose questioni cui necessita rispondere prima che una tale terapia possa diventare praticabile. Soprattutto importante è conoscere la potenzialità delle cellule staminali di trapiantarsi nelle vie aeree dei pazienti CF. Inoltre, l'annidamento delle cellule staminali secondo destinazioni di specifici organi necessita di essere chiarito. Nel caso della fibrosi cistica sarà importante determinare se sarà sufficiente correggere l'epitelio delle vie aeree, dal momento che appare esservi anche un coinvolgimento importante di cellule dell'immunità nella progressione della malattia. Se da un lato questo studio rappresenta solo un primo gradino nella valutazione della potenzialità terapeutica delle cellule staminali midollari per la fibrosi cistica, d'altro canto gli autori dello studio forniscono dati che indicano sicuramente un possibile ruolo di queste cellule nel trattamento della malattia e provvedono conoscenze sui fattori che possono essere importanti nel potenziare la loro differenziazione in cellule respiratorie.*

## Prevenzione e controllo dell'infezione respiratoria in Fibrosi Cistica



### Roberto Buzzetti

*Gruppo di Lavoro "Infection Control", Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (Verona)*

*Medico, Specialista in Statistica Medica, ha svolto in passato attività come pediatra ospedaliero e di famiglia. Successivamente si è dedicato all'Epidemiologia Clinica ed all'organizzazione dei Servizi Sanitari, in particolare in ambito infantile. Ha diretto l'Ufficio Epidemiologico dell'ASL di Bergamo. Lavora come consulente presso varie agenzie, tra cui il CeVEAS di Modena (Centro per la Valutazione dell'Efficacia dell'Assistenza Sanitaria), dove si occupa di EBM e linee guida sia a livello didattico che di ricerca. Docente in svariati corsi di rilievo nazionale su argomenti di statistica, epidemiologia clinica, medicina basata sulle prove e autore di un'ottantina di lavori scientifici, ha, tra i principali interessi scientifici, la teoria dei test diagnostici, la farmaco-epidemiologia, la metodologia clinica. Lavora presso l'Università di Modena e Reggio Emilia, come cultore della materia di Statistica medica ed Epidemiologia. È stato conduttore nel 2002-2003 del Percorso Formativo "Dai problemi dei pazienti alla ricerca di soluzioni, tra analisi organizzativa e ricerca clinica", organizzato dalla Fondazione FFC. Di seguito è stato il coordinatore del Gruppo di Lavoro "Infection Control" che ha prodotto i contenuti da cui deriva il presente report.*



### Cesare Braggion

*Gruppo di Lavoro "Infection Control", Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica (Verona)*

*Il Dr Cesare Braggion è dirigente medico presso il Centro FC di Verona, presso cui opera da circa 25 anni. Egli è presso tale Centro responsabile del servizio di Broncologia e Fisioterapia Respiratoria. Esperto nella disciplina broncopneumologica, ha creato e coordinato un qualificato laboratorio di funzionalità respiratoria, presso il quale si sono formati parecchi medici e tecnici. Si occupa in particolare dell'assistenza a malati severi in insufficienza respiratoria, tra cui quelli che vengono preparati al trapianto polmonare. Svolge funzioni didattiche soprattutto in campo di riabilitazione respiratoria. I suoi interessi di ricerca sono principalmente rivolti a tematiche di fisiopatologia respiratoria, monitoraggio del paziente in insufficienza respiratoria, aerosolterapia, fisioterapia e riabilitazione respiratoria. È attualmente presidente della Società Italiana Fibrosi Cistica (SIFC) ed ha fatto parte del gruppo di lavoro "Infection Control"*



La colonizzazione cronica da parte di alcuni microrganismi è considerato uno dei punti critici della vita del paziente fibrocistico, forse il più temuto. È infatti convinzione diffusa, e probabilmente fondata, che essa possa portare come conseguenza un peggioramento della prognosi. Una serie di misure "preventive" sono attualmente messe in atto nel tentativo di prevenire l'instaurarsi dell'evento infettivo: tra queste una serie di misure igieniche orientate a evitare la trasmissione di germi patogeni da paziente a paziente, specie negli ambienti di cura. Non sempre tuttavia tali misure, alcune anche molto impegnative, come la segregazione dei malati, appaiono sorrette da prove solide della loro efficacia, tant'è che il comportamento dei diversi Centri (in Italia e all'estero) è parecchio variabile nei modi e nei tempi di attuazione delle misure preventive.

Questo lavoro è stato pertanto mosso dall'obiettivo di condurre una **revisione critica della letteratura scientifica** (1) disponibile sui principali aspetti del controllo dell'infezione, quali:

- A. La relazione tra infezioni ed esiti clinici (prognosi)
- B. La trasmissibilità dei vari germi
- C. I fattori di rischio per l'acquisizione dell'infezione
- D. Il ruolo delle pratiche igieniche e dell'ambiente di cura nel prevenire la diffusione dell'infezione

Per ognuno dei quesiti, sono state esaminate per un'analisi comparata le linee guida più importanti a livello internazionale (USA, Regno Unito, Francia, Europa, CDC) (2-8); ci si è inoltre chiesti quali indicazioni fossero contenute nella letteratura scientifica (revisioni sistematiche, studi sperimentali e studi di osservazione).

## Risultati

La lettura comparata di ben 7 linee guida internazionali e di circa 400 articoli tratti dalla letteratura ha permesso di trarre le seguenti conclusioni:

### A) Relazione tra infezioni ed esiti clinici/prognosi

- Sembra essere presente relazione causale fra prima infezione e infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) ovvero la transizione da Pa non mucoide a Pa mucoide.
- Le infezioni croniche da Pa e *Burkholderia cepacia complex* (Bcc) sembrano associarsi in modo rilevante a un peggioramento dell'andamento clinico e della prognosi nei pazienti FC.
- L'impatto prognostico di *Staphylococcus aureus* (Sa) rimane da valutare data la scarsità di dati disponibili. Lo stesso dicasi per i cosiddetti germi emergenti: *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm), *Alcaligenes xylosoxidans* (Ax), Micobatteri non tubercolari (NTMB).

### B) Trasmissione e trasmissibilità

#### C) Fattori di rischio per (o protettivi verso) l'acquisizione dei germi

- Il sesso femminile si associa ad una acquisizione più precoce di Pa mucoide cronico.
- La più precoce età di prima comparsa di Pa o di colonizzazione da Pa, lo stato di infezione da parte di Pa mucoide o un rischio di acquisire Pa sono stati associati ad un genotipo con mutazioni cosiddette "severe" (classe I, II, III).
- Lo screening neonatale non si associerebbe a un ritardo di acquisizione di Pa rispetto ad una diagnosi per sintomi.
- Studi di epidemiologia molecolare documentano la trasmissione di cloni di *Staphylococcus aureus* (Sa), *Staphylococcus aureus* multiresistente (Mrsa), Pa, *Burkholderia cepacia complex* (Bcc), Sm e Ax fra pazienti.
- È documentata la trasmissione dei principali patogeni attraverso il contatto diretto o indiretto con le secrezioni.
- La trasmissione per via aerogena dei patogeni classici della FC non è documentata e la trasmissione avviene principalmente attraverso le goccioline o per contatto diretto.
- I contatti stretti fra pazienti e gli ambienti affollati facilitano la diffusione di ceppi.
- Il ruolo dell'ambiente esterno e dell'ambiente domestico nell'acquisizione dei patogeni classici della FC, soprattutto per i Gram negativi non fermentanti, deve essere definito con certezza. La sorveglianza microbiologica non può riguardare esclusivamente l'ambiente di cura.

- Le vasche e gli ambienti umidi, costituiscono un ambiente in cui i gram negativi possono facilmente sopravvivere.
  - Tutti gli oggetti connessi con l'ambiente di cura esposti alle secrezioni dei pazienti possono essere contaminati e possono costituire fonte di infezione. Il germe si può ritrovare nei lavandini, sulle mani di pazienti e del personale, nella strumentazione per l'aerosol-terapia e per la spirometria, nell'aria dopo una seduta di fisioterapia.
  - Per Pa. Le conoscenze più consolidate sulla trasmissione di Pa sono relative a:
    - Trasmissione di ceppi in pazienti ricoverati all'interno di strutture ospedaliere
    - Trasmissione nei campi di vacanza per pazienti o trasmissione di ceppi attraverso i contatti sociali
    - Superinfezione da parte di ceppi altamente trasmissibili
    - Ceppi altamente trasmissibili descritti frequentemente come ceppi multiresistenti
    - Generale necessità di segregare e evitare la socializzazione per ridurre il rischio di infezioni crociate
    - Incremento di morbilità associato a trasmissione di ceppi epidemici
  - Per Bcc. Le conoscenze più consolidate sulla trasmissione di Bcc sono relative a:
    - Trasmissione di ceppi in pazienti ricoverati all'interno di strutture ospedaliere
    - Trasmissione di ceppi nei campi estivi o trasmissione attraverso i contatti sociali
    - Superinfezione con ceppi appartenenti a diversi genomovars
    - Generale necessità di segregare e evitare la socializzazione per ridurre il rischio di infezioni crociate
    - Epidemie su larga scala
- D) Ruolo delle pratiche igieniche e dell'ambiente di cura nel prevenire la diffusione**
- Colpisce la disparità di giudizio tra le diverse linee guida a proposito di disinfezione routinaria delle superfici non critiche dell'ambulatorio FC e degli oggetti con cui i pazienti vengono a contatto. Non sono stati trovati studi condotti in ambito FC che abbiano indagato l'efficacia dei diversi disinfettanti verso i diversi patogeni respiratori.
  - C'è consenso sulla necessità di sottoporre i dispositivi personali a disinfezione periodica ma i protocolli di disinfezione proposti differiscono notevolmente.
  - Per quanto riguarda gli scarichi dei lavandini dei centri FC, noti per essere reservoir di Pa, le linee guida raccomandano di attuare una disinfezione regolare.
  - L'effetto della partecipazione a campi estivi specifici per ragazzi con FC, caratterizzati da rapporti sociali prolungati e ravvicinati, senza alcuna limitazione, sembra da evitare, pur in presenza di pareri contrastanti.
  - L'applicazione dell'isolamento dei pazienti durante l'ospedalizzazione ha ridotto l'incidenza di nuove infezioni, anche se non l'ha completamente abolita. Tutte le linee guida concordano sulla necessità di segregare (o separare, isolare) i pazienti con Bcc tra di loro e da tutti gli altri, sia in regime ambulatoriale che in regime di ricovero.
  - Viene spesso associata l'introduzione di politiche complessive di controllo delle infezioni (comprendenti la segregazione dei colonizzati), adottate in due diversi centri FC, ad una riduzione di incidenza e prevalenza di Bcc e Pa.
  - La segregazione viene generalmente intesa dalle linee guida come la separazione in giorni di ambulatorio diversi ma anche, specie per Bcc, in locali diversi.
  - Per i pazienti in regime di ricovero, è riconosciuta da tutte le linee guida la necessità di collocare i pazienti in stanze singole con servizi propri per prevenire l'infezione crociata con altri pazienti FC.
  - Evitare l'affollamento di pazienti in attesa e ridurre il più possibile i tempi di attesa nella sala d'aspetto è raccomandato da alcune LG per prevenire l'infezione crociata.
  - Nelle linee guida, c'è generale consenso sul ruolo delle mani degli operatori nell'infezione crociata. Tutte le LG raccomandano infatti un'accurata igiene delle mani degli operatori.
  - Per quanto riguarda le misure che i pazienti possono adottare per prevenire le infezioni, le linee guida sono dunque concordi nel raccomandare:
    - un'accurata igiene delle mani, specialmente in occasione dei contatti con i centri di cura;

- il contenimento delle secrezioni emesse con la tosse e lo starnuto in presenza di altri pazienti e in occasione dei contatti con i centri di cura;
- il mantenimento della distanza di un metro da tutti gli altri pz FC
- il non condividere con altre persone FC utensili e dispositivi che entrano in contatto con la mucosa orale e nasale.
- l'evitare situazioni di contatto ravvicinato o prolungato in ambienti chiusi con altre persone FC e l'evitare il sovraffollamento in occasioni in cui è probabile la presenza di persone FC (ad es. congressi, convegni)
- Non esiste consenso sull'efficacia dell'uso della mascherina da parte dei pz in occasione della loro presenza nei centri di cura.

### Dal punto di vista del metodo

Il livello generale degli studi non è molto elevato. Sono piuttosto rari gli studi di coorte prospettici. Talvolta manca anche un vero gruppo di controllo,

selezionato come tale all'inizio dello studio. La numerosità dei pazienti studiati è generalmente piccola, specie negli studi prospettici.

Anche per l'area D (ruolo delle pratiche igieniche e dell'ambiente di cura nel prevenire la diffusione) sono pochi gli studi di buon disegno che indagano l'efficacia di misure di prevenzione delle infezioni da patogeni respiratori nello specifico ambito FC. Molte delle misure storicamente adottate nei centri FC per prevenire la trasmissione dei patogeni (ad esempio la segregazione), sono state adottate in situazioni di "emergenza" costituite dal verificarsi di epidemie che hanno provocato bruschi innalzamenti di morbilità e mortalità tra i pazienti FC.

I dati raccolti in ambito specifico FC a sostegno dell'impiego di queste misure provengono prevalentemente da studi retrospettivamente condotti su dati storici, che hanno indagato sulla presenza di fattori di rischio, associati nelle persone FC all'acquisizione di determinati patogeni, oppure dalla documentazione di particolari vie di trasmissione, oppure dalla individuazione di sorgenti di



*Il Gruppo di Lavoro FFC che ha partecipato in gran parte all'analisi della letteratura.*

infezione nei luoghi di cura, con conseguente adozione di misure empiriche di prevenzione, basate quindi sul razionale teorico della presenza di un dato fattore di rischio o della possibilità di una via di trasmissione.

L'efficacia di queste misure rimane nella gran parte dei casi non sperimentata attraverso la conduzione di studi controllati, e quindi non provata. La possibilità di sottoporle a sperimentazione è controversa e solleva fondati dubbi di carattere etico.

Le linee guida esistenti basano le loro raccomandazioni principalmente su studi o su altre linee guida non FC-specifiche. In numerosi casi le raccomandazioni sono state formulate sulla base di esperienze cliniche e pareri di esperti; in molti altri casi, raccomandazioni di forza anche elevata sono fondate su prove di efficacia raccolte in campi diversi dalla FC o sulla identificazione (retrospettiva) di fattori di rischio per la trasmissione. Solo in un numero relativamente basso di casi esse sono basate su vere prove di efficacia.

---

## Abbreviazioni

Pa: *Pseudomonas aeruginosa*

Bcc: *Burkholderia cepacia complex*

Sa: *Staphylococcus aureus* (MSSa: *Sa* meticillino sensibile; MRSA: *Sa* meticillino resistente)

Ax: *Alcaligenes xylosoxidans*

Sm: *Stenotrophomonas maltophilia*

NTMB: *Micobatteri non tubercolari*

## Bibliografia

1. Braggion C, Buzzetti R, Festini F, Mastella G, Salvatore D, Taccetti G, Baldo E, Battistini F, Bertasi S, Braccini G, Campana S, Cappelletti L, Cariani L, Costantini D, Fiscarelli E, Furnari ML, Gagliardini R, Grosso B, Mangiantini F, Melotti P, Neri AS, Pizzamiglio G, Provenzano E, Ricci L, Romano L, Scambi C, Spaggiari C, Zuffo S, Bassi C. Il controllo e la prevenzione delle infezioni respiratorie nel paziente affetto da fibrosi cistica. Ed. Fondazione Ricerca FC, 2005, Verona.
2. Saiman L, Siegel J, Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: Microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control* 2003; 31 (3): S1-S62.
3. CF Trust Infection Control Group. *Pseudomonas aeruginosa* infection in people with CF: suggestions for prevention and infection control. Cystic Fibrosis Trust, 2001, Bromley.
4. CF Trust Infection Control Group. A statement on *Burkholderia cepacia*. Cystic Fibrosis Trust, 1999, Bromley.
5. Branger B, Ravilly S, Houzard S. Recommendations pour la prevention de l'acquisition et de la transmission des germes respiratoires dans la mucoviscidose. Ed. Association Française "Vaincre la Mucoviscidose" 2004, Paris.
6. Doering G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 2004; 3: 67- 91.
7. Schulster LM, Chinn RYW, Arduino MJ, Carpenter J, Donlan R, Ashford D, Besser R, Fields B, McNeil MM, Whitney C, Wong S, Juraneck D, Cleveland J. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations from CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Chicago IL; American Society for Healthcare Engineering/American Hospital Association; 2004.
8. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, October 25, 2002 / Vol. 51 / No. RR-16.

# MODERATORI DEL SEMINARIO

Dr Luis Galieta, biologo molecolare  
(Istituto G. Gaslini, Genova)



Dr Faustina Lalatta, consulente genetica  
(Fondazione Istituti Clinici  
di Perfezionamento, Milano)



Prof. Giuseppe Novelli, biologo molecolare  
genetista (Università Tor Vergata, Roma)



Dr. Graziella Borgo, Medico genetista  
(Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona)

Prof. Giuseppe Magazzù, Professore di Pediatria  
(Università di Messina, Servizio di Gastroenterologia  
pediatrica e Centro Fibrosi Cistica)



