

# Indice

Introduzione.....	1
Capitolo 1 Ritardo di crescita extrauterino .....	2
1.1 Problematiche aperte .....	2
1.2 Nutrizione enterale .....	5
Capitolo 2 Valutazione chimico-fisica del latte materno.....	9
2.1 Premesse.....	9
2.2 Analisi della composizione del latte materno .....	9
2.2.1 Valutazione mediante metodica NIRA .....	10
2.3 Valutazione dell'osmolarità del latte materno .....	11
Capitolo 3 Reflusso gastroesofageo nel neonato prematuro.....	13
3.1 Epidemiologia, fisiopatologia, clinica .....	13
3.2 Approcci diagnostici .....	14
3.2.1 pH-metria esofagea .....	14
3.2.2 Impedenziometria intraluminale e pH-impedenziometria ....	15
Capitolo 4 Studio sperimentale.....	17
4.1 Premesse.....	17
4.2 Obiettivi dello studio.....	19
4.3 Disegno dello studio.....	20
4.4 Metodi dello studio .....	24
4.4.1 NIRA (Near-Infrared Reflectance Analysis) .....	24
4.4.2 Metodiche di laboratorio .....	25
4.4.3 pH-impedenziometria.....	25
4.4.4 NIRA .....	28
4.4.5 Valutazione dell'osmolarità .....	28
4.5 Analisi statistica .....	29
Capitolo 5 Risultati sperimentali .....	30
5.1 Analisi dei dati .....	30
5.1.1 Accuratezza della metodica NIRA.....	30

---

5.1.2	Valutazione della composizione del latte materno.....	33
5.1.3	Utilizzo della metodica NIRA validata .....	34
5.1.4	GER e latte materno prima e dopo fortificazione .....	35
5.2	Conclusioni .....	38
	Bibliografia.....	43

## Introduzione

I continui progressi della terapia intensiva neonatale consentono attualmente la sopravvivenza di fasce di neonati estremamente prematuri. Questi neonati presentano un notevole ritardo della crescita postnatale, rispetto al trend di crescita intrauterino, che si concretizza in un quadro di ritardo di crescita extrauterino. Particolarmente colpiti sono i neonati ELBW (PN <1000). Le problematiche legate alla prematurità rendono difficile adeguare gli apporti nutrizionali alle necessità metaboliche, di questa categoria di neonati, con un elevato rischio di malnutrizione e scarso accrescimento; le scelte nutrizionali rivestono quindi un ruolo fondamentale nella gestione del neonato prematuro. Poiché le carenze nutrizionali qualitative e quantitative sono in grado di determinare squilibri metabolici con gravi conseguenze sullo sviluppo fisico e psicomotorio, appare evidente la necessità di ottimizzare gli apporti nutrizionali per garantire un corretto accrescimento e un adeguato sviluppo neuropsichico.

## Capitolo 1

### Ritardo di crescita extrauterino

#### 1.1 Problematiche aperte

Nel neonato prematuro, l'adattamento alla vita extrauterina comporta un enorme dispendio energetico legato al mantenimento della termoregolazione e dell'attività respiratoria, ai cambiamenti metabolici ed ai processi di crescita e di sintesi tissutale. Durante questo periodo i neonati prematuri possono perdere fino al 20% del loro peso alla nascita, e il periodo necessario al recupero di questa perdita di peso sembra influenzare il successivo ritmo di crescita<sup>1</sup>. Lo scarso accrescimento postnatale costituisce uno dei più comuni problemi legati alla nascita pretermine. Sono stati individuati numerosi fattori coinvolti (sesso maschile, necessità di assistenza respiratoria, terapia steroidea, enterocolite necrotizzante), tuttavia i fattori determinanti sono l'imaturità ed il basso peso alla nascita. I neonati prematuri sono a rischio di sviluppare severi deficit nutrizionali soprattutto nelle prime settimane di vita, in quanto è difficile assicurare e soprattutto mantenere adeguati apporti nutrizionali nel corso dell'ospedalizzazione. L'American Academy of Pediatric Committee on Nutrition (AAP) definisce gli apporti "adeguati" se questi sono in grado di assicurare un ritmo di crescita quantitativamente e qualitativamente paragonabile a quella di un feto normale della stessa età post-concezionale<sup>2 3</sup>. Le maggiori difficoltà si incontrano nel tentativo di adeguare le necessità metaboliche all'imaturità del sistema gastrointestinale e alle condizioni cliniche, spesso critiche, di questi neonati. Inoltre gli apporti nutrizionali, pur assicurando i fabbisogni necessari per una crescita adeguata, non tengono conto della necessità di recupero dei deficit nutrizionali che si instaurano

soprattutto nelle prime settimane di vita. I deficit principalmente riscontrati riguardano gli apporti proteici e calorici. In accordo con le linee guida dell'American Academy of Pediatrics gli apporti attualmente raccomandati prevedono un intake proteico da 3,5 a 4 g/kg/die e un intake lipidico da 5,4 a 7,2 g/kg/die, con un intake calorico di 100-130 kcal/kg/die<sup>4</sup>; tali apporti vengono raggiunti tardivamente e questo comporta un deficit proteico ed energetico cumulativo nel corso dell'ospedalizzazione. Numerosi studi evidenziano come, soprattutto nelle prime settimane di vita, gli apporti utilizzati nell'alimentazione dei neonati ELBW siano in realtà nettamente inferiori rispetto a quelli raccomandati<sup>5 6</sup>. Emerge quindi sia la difficoltà nel raggiungere e mantenere gli apporti nutritivi raccomandati, che l'incapacità di bilanciare i deficit che si accumulano. Questo comporta l'instaurarsi di importanti quadri di ritardo di crescita extrauterino<sup>7</sup>, con valori di peso, lunghezza e circonferenza cranica inferiori al 10° percentile, rispetto ai valori previsti dal ritmo di crescita intrauterina<sup>8</sup>.

Lo scarso accrescimento resta un grosso problema anche al momento della dimissione, in particolare per i neonati di basso peso per l'età gestazionale (SGA). L'accumulo dei deficit nutrizionali condiziona in maniera estremamente negativa la crescita, tanto che, anche un numero notevole di neonati con un peso appropriato per l'età gestazionale alla nascita (AGA), viene dimesso con un peso inferiore al 10° p. Tuttavia il peso estremamente basso alla nascita peggiora questo trend di crescita negativo, infatti la maggior incidenza di ritardo di crescita extrauterino (EUGR) si ha per quei neonati con basso peso alla nascita, e in maggior percentuale tra gli SGA<sup>7</sup>, in particolare se con peso <750 g.

I neonati ELBW, che presentano un rallentamento della crescita a 3 mesi età corretta, nonostante tendano al recupero entro il 10° anno, si mantengono comunque al disotto rispetto ai ritmi di crescita dei neonati non ELBW<sup>9</sup>. Giovani adulti nati ELBW, valutati a 20 anni, si presentano significativamente più piccoli per quanto riguarda tutti i parametri accrescitivi (peso, lunghezza, circonferenza cranica) rispetto a neonati non ELBW.

La crescita, valutata come aumento del peso della lunghezza e della circonferenza cranica, costituisce l'evidenza macroscopica dello stato nutrizionale, tuttavia, le carenze nutrizionali in termini di energia e di micronutrienti condizionano tutti i processi di sviluppo, come accade ad esempio a livello cerebrale, dove l'apporto energetico è fondamentale per la divisione cellulare, la crescita neuronale ed i processi di mielinizzazione; o a livello del sistema immunitario, la cui funzionalità è condizionata negativamente dai deficit proteici. Il ritardo di crescita postnatale si associa ad esiti neurologici a distanza e scarse performance scolastiche. La crescita inadeguata della circonferenza cranica a 8 mesi sarebbe predittiva di bassi QI, scarso rendimento scolastico, difficoltà nel linguaggio e alta incidenza di iperattività<sup>10</sup>. Neonati AGA e SGA che a 2 anni di vita presentano un peso < 10° percentile, mostrano livelli di sviluppo neurocognitivo significativamente inferiore rispetto a neonati di pari peso alla nascita ma con un livello di crescita adeguato. Questo ritardo nello sviluppo neurocognitivo si conferma anche a 8 anni<sup>9</sup>. L'attuazione di un regime nutrizionale che consenta di limitare l'incidenza del ritardo di crescita extrauterino costituisce quindi un elemento di criticità nella gestione del neonato prematuro nel corso dell'ospedalizzazione. Dopo la dimissione sembra esserci un maggior recupero nella crescita<sup>1</sup>, probabilmente da attribuirsi ad un regime alimentare più libero. E' tuttora aperto il dibattito sulla necessità di utilizzare latti formulati per prematuri anche dopo la dimissione. Al momento, le evidenze di un miglior accrescimento staturale-ponderale, a seguito dell'utilizzo prolungato di formule per pretermine, sono limitate e non si hanno dati sull'outcome cognitivo, sono pertanto necessari studi ulteriori a tal proposito<sup>11</sup>. Garantire un adeguato ritmo di crescita risulta fondamentale anche per garantire un corretto sviluppo neurocognitivo in questa categoria di neonati a rischio.

Appare di fondamentale importanza per i neonatologi individuare strategie nutrizionali che consentano di ottimizzare gli apporti per questa categoria di neonati a rischio, perfezionando ed uniformando linee guida per l'alimentazione nel corso dell'ospedalizzazione e alla dimissione.

## 1.2 Nutrizione enterale

Benché la nutrizione parenterale svolga un ruolo fondamentale nel mantenimento dello stato nutrizionale, le più recenti raccomandazioni sottolineano come la precoce alimentazione enterale, anche con minime quantità di latte, rivesta un ruolo di fondamentale importanza nella maturazione del sistema gastrointestinale, e sia in grado di condizionare positivamente tutti i processi di adattamento postnatale<sup>12</sup>.

Questa modalità di alimentazione, definita come minimal enteral feeding, (MEF) gut priming o trophic feeding, prevede la somministrazione di minimi volumi di latte: 12-24 ml /kg/die, da iniziare nei primi giorni di vita, in base alle condizioni cliniche del neonato, e comunque il prima possibile<sup>13 14 15 16 17</sup>. Sono comunque utili anche apporti ulteriormente ridotti (5-25 ml/kg/die), se le condizioni cliniche del paziente lo richiedono. Alcune situazioni cliniche possono costituire indicazione ad un ritardo nell'introduzione della MEF, tra queste: quadri di ipossia come nei casi di asfissia severa e danno ipossico-ischemico; condizioni associate a ridotto flusso intestinale con quadri di marcata ipotensione o presenza di furto diastolico a livello intestinale legato alla presenza di dotti arteriosi (PDA) emodinamicamente significativi; PDA in trattamento con indometacina<sup>14</sup>.

E' è ormai accertato che l'inizio precoce dell'alimentazione enterale sia in grado di favorire lo sviluppo gastrointestinale, promuovendo ed accelerando il processo di maturazione delle funzioni intestinali, attraverso un effetto di stimolo sia sulla secrezione di ormoni fondamentali per il trofismo intestinale che sulla motilità intestinale<sup>12 13</sup>.

Il timing di tutte le tappe di sviluppo delle funzioni gastrointestinali viene influenzato positivamente, infatti la precoce introduzione dell'alimentazione enterale migliora la tolleranza alimentare, riduce la necessità del supporto nutrizionale parenterale e consente un più rapido raggiungimento dell'alimentazione enterale completa. La ridotta necessità di NP si traduce in un minor rischio di complicanze legate al posizionamento prolungato di vie

centrali, soprattutto complicanze infettive, comporta una minor durata dell'ospedalizzazione, riduce l'incidenza di colestasi e di osteopenia del prematuro<sup>14</sup>. Non è stata individuata una maggiore incidenza di enterocolite necrotizzante nei neonati sottoposti a minimal enteral feeding<sup>13</sup>. La progressione del regime enterale può essere eseguita senza problemi con aumenti tra 10 e 20 ml/kg/die. Una progressione più rapida, verso l'alimentazione enterale completa ("full enteral feeding": 150 ml/kg/die di latte, che corrisponde all'assunzione di 120 kcal/kg/die.), con volumi superiori ai 35 ml/kg/die, sembra tuttavia associarsi ad un aumento del rischio di enterocolite necrotizzante (NEC)<sup>18 19</sup>.

Di prima scelta per l'inizio dell'alimentazione enterale è il latte materno<sup>20 21</sup> che estende i suoi benefici effetti nutrizionali anche per il neonato prematuro. Il latte materno presenta infatti un maggior contenuto di aminoacidi essenziali (cisteina e taurina), è ricco di nucleotidi e fattori di crescita, il suo contenuto di lipasi favorisce l'assorbimento degli acidi grassi polinsaturi. Presenta inoltre un contenuto di oligoelementi a maggiore biodisponibilità, riduce il rischio di allergie, nel primo anno di vita<sup>2</sup> e si associa ad un miglior sviluppo neuro cognitivo<sup>9</sup>. Per le sue caratteristiche immunologiche conferisce protezione antimicrobica, riduce il rischio di infezioni del tratto gastrointestinale e di NEC, infatti la presenza di IgA materne, fattori di crescita come l'epidermal growth factor (EGF), elementi prebiotici, che favoriscono la replicazione di batteri commensali intestinali, e citochine antinfiammatorie, costituiscono importanti fattori protettivi per la mucosa intestinale<sup>22</sup>. Le attuali strategie nutrizionali utilizzate per ridurre il rischio di NEC nei neonati pretermine, individuano nell'utilizzo del latte materno il principale fattore protettivo: il suo utilizzo infatti riduce di 6 volte il rischio di NEC, non solo nei neonati alimentati con esclusivo latte materno ma anche nell'allattamento misto<sup>23 24</sup>. Si è infatti evidenziato come l'utilizzo esclusivo delle formule per prematuri sia associato ad un maggior rischio di sviluppare NEC, sia rispetto al latte materno, ma anche rispetto al latte di banca<sup>21</sup>.

Tuttavia, il solo latte materno non è in grado di sopperire alle maggiori necessità nutrizionali dei neonati prematuri, soprattutto in termini di energia e contenuti proteici, ma anche sodio, fosfato e calcio è quindi necessario utilizzare prodotti definiti “fortificanti del latte materno”, in grado di aumentarne il contenuto proteico, energetico e minerale<sup>4 14 25</sup>. I fortificanti del latte materno sono prodotti industriali contenenti proteine idrolizzate, derivate prevalentemente da siero di latte vaccino; carboidrati, rappresentati prevalentemente da polimeri di glucosio e maltodestrine, macronutrienti quali sodio, calcio fosforo e magnesio, oligoelementi e vitamine. L’aggiunta al latte materno, quando gli apporti raggiunti sono di 100 ml/kg/die, si associa ad un significativo miglioramento della crescita sia per il peso che per la lunghezza e la circonferenza cranica. Il bilancio azotato risulta positivo, ma il BUN non supera i livelli di normalità. Non sembra esserci un effetto significativo sul metabolismo osseo né sullo sviluppo neuromotorio, ma questo è dovuto essenzialmente alla mancanza di dati di follow-up, tuttavia un più elevato contenuto proteico nella dieta dei prematuri si associa da un miglior sviluppo anche neurocognitivo<sup>14</sup>. Al contrario di quanto accade per il latte formulato, l’utilizzo dei fortificanti non si associa ad un maggior rischio di NEC<sup>25</sup>.

Attualmente l’utilizzo dei fortificanti viene effettuato aggiungendo quantità standard di fortificante al latte materno, a prescindere dalla concentrazione proteica del latte stesso. Utilizzando un regime standardizzato esiste quindi il rischio di operare una fortificazione eccessiva, apportando un carico proteico superiore ai valori raccomandati o al contrario di fortificare in maniera inadeguata senza raggiungere gli apporti minimi raccomandati.

A tutt’oggi gli studi sulla fortificazione individualizzata sono pochi ed eterogenei rispetto ai parametri utilizzati per valutare l’entità della fortificazione, tuttavia dimostrano che un regime di fortificazione personalizzata, rispetto alla fortificazione standard sia in grado di garantire una crescita più adeguata<sup>26 27</sup>.

Recentemente è stata inoltre focalizzata l’attenzione anche sulle problematiche legate ad un’eccessiva alimentazione. E’ infatti emerso che una

crescita eccessiva, in termini di incremento ponderale, degli ELBW sia nei primi mesi, che nei primi due anni di vita si associa ad un maggior rischio di sviluppare obesità, ipertensione e problematiche cardiovascolari<sup>9 28</sup>. La necessità di adeguare gli apporti nutrizionali ai fabbisogni appare quindi di fondamentale importanza sia per garantire un corretto accrescimento che per evitare le problematiche legate ad una crescita eccessiva.

## Capitolo 2

### Valutazione chimico-fisica del latte materno

#### 2.1 Premesse

Nel valutare il possibile effetto della fortificazione del latte materno sulla tolleranza alimentare, ed in particolare sull'incidenza di reflusso gastroesofageo, rivestono particolare importanza le variazioni che interessano le proprietà chimico-fisiche del latte materno in seguito all'aggiunta del fortificante. Nello specifico, sembrano rivestire un ruolo significativo le modifiche dell'osmolarità e le variazioni del contenuto lipidico e proteico.

#### 2.2 Analisi della composizione del latte materno

Vista l'elevata variabilità del contenuto in nutrienti del latte materno, che, oltre ad essere interindividuale, appare condizionata anche da altri fattori tra cui l'età gestazionale al momento del parto, le settimane di vita post-natali e persino le varie fasi del giorno<sup>29 30</sup>, l'analisi della sua composizione prima e dopo fortificazione risulta essere di particolar interesse.

Sull'effetto della fortificazione sulla concentrazione proteica e lipidica del latte materno e sull'impatto che questo comporta sulla tolleranza alimentare e sul reflusso, sono a tutt'oggi disponibili pochi studi da cui emergono risultati contrastanti. Secondo alcuni l'aggiunta di fortificante al latte materno rallenterebbe significativamente lo svuotamento gastrico rispetto al latte

materno non fortificato<sup>31</sup>. Al contrario, altri hanno evidenziato l'assenza di questi effetti di rallentamento<sup>32,33</sup>.

Secondo alcuni autori il contenuto lipidico del latte materno rallenterebbe lo svuotamento gastrico e questo comporterebbe effetti sul GER<sup>34</sup>, altri negano invece la presenza di una relazione tra svuotamento gastrico e reflusso gastroesofageo nei neonati prematuri<sup>35</sup>.

Per valutare gli effetti della fortificazione sulle caratteristiche nutrizionali del latte materno appare di importanza fondamentale la valutazione delle sue caratteristiche intrinseche ed in particolare della concentrazione proteica e lipidica. L'analisi routinaria della composizione del latte materno è di difficile esecuzione per la mancanza di tecniche che siano rapide e facilmente applicabili nella pratica clinica. Le metodiche a disposizione sono infatti test laboratoristici complessi e che richiedono personale specializzato e tempi di esecuzione non compatibili con la pratica clinica routinaria.

### **2.2.1 Valutazione mediante metodica NIRA**

Negli ultimi anni si è diffuso l'utilizzo di una nuova metodica ad infrarossi Near Infrared Reflectance Analysis (NIRA) per l'analisi della composizione di materiali biologici. Questa metodica trova ampio utilizzo in campo agrario (cereali)<sup>36,37</sup>, veterinario (latte di capra)<sup>38</sup>, e umano (latte, feci)<sup>39,40,41,42</sup>.

L'analisi viene effettuata rapidamente (circa 1 minuto), e consente la valutazione simultanea del contenuto in acqua, azoto, lipidi, zuccheri. Per l'analisi sono sufficienti piccole quantità di campione. Non è necessario l'utilizzo di reagenti e viene richiesta una manipolazione minima del materiale: è infatti sufficiente una rapida omogeneizzazione manuale. Il materiale può essere analizzato fresco o può essere conservato ad una temperatura di -20°C.

L'unico svantaggio di questa tecnica è rappresentato dal fatto che la macchina deve essere calibrata utilizzando i valori dei metodi chimici tradizionali.

In ambito medico la metodica nasce come strumento calibrato e validato per l'analisi delle feci. Rispetto alle metodiche tradizionali, che richiedono costi e tempi elevati ed una lunga manipolazione del materiale, si rivela uno strumento accurato, rapido e di pratico utilizzo clinico; trova ampio impiego nella valutazione e nel monitoraggio dei malassorbimenti<sup>43 40 42</sup>.

Per quanto riguarda il suo utilizzo nella determinazione della composizione del latte, la In ambito medico la metodica nasce come strumento calibrato e validato per l'analisi delle feci. Rispetto alle metodiche tradizionali, che richiedono costi e tempi elevati ed una lunga manipolazione del materiale, si rivela uno strumento accurato, rapido e di pratico utilizzo clinico; trova ampio impiego nella valutazione e nel monitoraggio dei malassorbimenti. NIRA si è rivelata una metodica attendibile ed accurata in studi eseguiti sul latte di capra e sul latte umano. Tuttavia a tutt'oggi gli studi condotti sul latte materno sono esigui; un solo un precedente studio ha comparato una metodica ad infrarossi con le metodiche tradizionali di riferimento (Kjeldahl per il dosaggio delle proteine e il Roesse-Gottlieb per i lipidi) nella valutazione del contenuto di macronutrienti del latte umano. In questo studio è stata analizzata la composizione di campioni di colostro, latte di madri di neonati pretermine, e di neonati a termine, dopo aver effettuato la calibrazione dello strumento utilizzando campioni di latte bovino<sup>41</sup>.

### 2.3 Valutazione dell'osmolarità del latte materno

L'aggiunta di fortificante al latte materno determina un aumento della sua osmolarità che sembra poter essere associata ad una serie di problemi clinici, quali distensione addominale e riduzione del tempo di svuotamento gastrico, che possono predisporre a episodi di GER<sup>44 45</sup>.

Diversi studi hanno valutato le variazioni di osmolarità in seguito alla fortificazione e hanno evidenziato come, molto spesso, l'aumento di tale

parametro ecceda il valore massimo consigliato per i neonati prematuri (400-425 mOsm/l), oltre il quale sembra aumentato il rischio di enterocolite necrotizzante (NEC)<sup>46</sup>. Alcuni ricercatori hanno valutato le variazioni dell'osmolarità del latte materno riproducendo le condizioni ambientali comuni nei reparti neonatologici: uno studio particolarmente interessante a tale proposito<sup>44</sup> ha determinato i valori di osmolarità su diversi campioni di latte materno, conservati a 4°C, a cui erano stati aggiunti diversi tipi di fortificante; le determinazioni sono state eseguite prima della fortificazione, immediatamente dopo e dopo ventiquattro ore. E' emerso un incremento dell'osmolarità del latte materno subito dopo fortificazione, e dopo 24 ore con un incremento significativo dei livelli di osmolarità nel tempo. La diversa composizione del fortificante inoltre è risultata responsabile di differenti incrementi di osmolarità<sup>47</sup>.

## Capitolo 3

### Reflusso gastroesofageo nel neonato prematuro

#### 3.1 Epidemiologia, fisiopatologia, clinica

Il GER è una condizione molto comune nel neonato, sia a termine che prematuro: in quest'ultimo, episodi di reflusso gastroesofageo si verificano in media dalle tre alle cinque volte ogni ora<sup>48 49</sup>.

La maggior parte dei dati della letteratura indicano una maggior frequenza di GER nei neonati prematuri rispetto ai nati a termine con un'elevata incidenza di concomitanti episodi di apnea ostruttiva o centrale<sup>50</sup>. Viene inoltre evidenziata<sup>51</sup> una correlazione significativa tra severità del reflusso e durata dell'ospedalizzazione.

Il reflusso gastroesofageo trae origine dall'alterazione di meccanismi fisiologici, tra cui il tono dello sfintere esofageo inferiore (LES), la motilità esofagea e lo svuotamento gastrico<sup>52</sup>. Nel neonato prematuro, oltre a questi fattori fisiopatologici, rivestono un ruolo importante i *fattori legati alla modalità di alimentazione*: una dieta costituita da elevati volumi di liquido, il mantenimento della posizione supina<sup>53 54</sup>, la modalità di somministrazione dei pasti (gavage, gastroclisi)<sup>55</sup> e la composizione del latte. Sebbene il latte svolga un importante ruolo di tampone nei confronti dell'acidità gastrica, lo stato fisico di liquido condiziona la grande facilità di reflusso in occasione dei rilasciamenti transitori del LES<sup>56</sup>.

L'aggiunta di fortificante al latte materno, fondamentale nei neonati prematuri per garantire apporti proteici ed energetici adeguati, determina un aumento dell'osmolarità. Questa sembra poter essere associata a: distensione

addominale e riduzione del tempo di svuotamento gastrico, che possono predisporre a episodi di GER<sup>45</sup>.

Dal punto di vista clinico nel neonato solo una minoranza degli episodi di reflusso è accompagnata da un rigurgito<sup>57</sup>. L'apnea è considerata una delle più frequenti manifestazioni atipiche del reflusso gastroesofageo, anche se la correlazione tra i due fenomeni risulta tuttora abbastanza controversa<sup>58 59</sup>. Apnea e GER sono spesso presenti contemporaneamente nei neonati prematuri e gli episodi di apnea occorrono principalmente nel periodo post-prandiale<sup>60 49</sup>. Al momento tuttavia, gli studi preposti a dimostrare una correlazione tra apnee e RGE forniscono risultati contrastanti<sup>61 62 63</sup>.

## 3.2 Approcci diagnostici

Nel neonato prematuro il dato clinico, non risulta sufficiente a porre una diagnosi certa di GER, è quindi necessario il ricorso a tecniche diagnostiche strumentali.

Le metodiche diagnostiche più frequentemente in uso<sup>49</sup> risultano essere, in ordine decrescente di impiego: clinica, pHmetria, esame radiologico con mezzo di contrasto, analisi delle secrezioni oro-faringee, endoscopia con biopsia, ultrasonografia, scintigrafia e manometria. Di recente introduzione è l'utilizzo combinato della pHmetria e dell'impedenziometria intraluminale.

### 3.2.1 pH-metria esofagea

La diagnosi di reflusso gastroesofageo in epoca neonatale, richiede una misurazione continua e per tale scopo la pHmetria esofagea nelle 24 ore rappresenta un adeguato strumento diagnostico<sup>49 64</sup>.

La pHmetria evidenzia il verificarsi di episodi *di reflusso acido, definiti come calo del pH esofageo al di sotto del valore 4*, e ne indica la durata e la

frequenza. Il software dello strumento calcola inoltre il cosiddetto *indice di reflusso (RI)*, ovvero la percentuale di tempo, sul totale delle 24 ore, in cui il pH misurato è inferiore a 4<sup>65</sup>, 42<sup>66</sup>.

Il principale limite del suo utilizzo nei neonati prematuri è legato al fatto che questa metodica non consente di individuare il verificarsi di reflussi non acidi, che risultano particolarmente frequenti in questo gruppo di soggetti.

### 3.2.2 Impedenziometria intraluminale e pH-impedenziometria

L'*impedenziometria intraluminale* o *Multichannel Intraluminal Impedance (MII)*<sup>67</sup> si è rivelata utile come presidio complementare alla manometria nella rilevazione delle alterazioni motorie dell'apparato gastrointestinale e come strumento diagnostico nella valutazione della malattia da reflusso gastroesofageo<sup>68 69</sup>.

La tecnica in questione prevede la registrazione delle variazioni di impedenza elettrica che si realizzano all'interno del lume intestinale al passaggio del bolo alimentare. In campo pediatrico è stato preso in considerazione l'impiego di questa metodica nello studio del reflusso gastroesofageo dei bambini e, in particolare, dei neonati<sup>70</sup>. L'impedenziometria intraluminale supera i limiti della pHmetria, poiché individua gli episodi di reflusso sulla base delle variazioni di impedenza nei diversi segmenti esofagei<sup>71</sup>.

L'impiego combinato di MII e pHmetria permette di distinguere i reflussi acidi dai non acidi e consente inoltre di individuare episodi di reflusso acido di durata inferiore ai 5 secondi ed *episodi di rereflusso*<sup>72 73</sup>. Con l'impedenziometria è possibile inoltre distinguere la natura fisica del materiale refluito<sup>74</sup>, che può essere liquido, gassoso o misto. L'utilizzo combinato di pHmetria e impedenziometria presenta quindi la potenzialità di divenire il nuovo gold standard nella diagnosi di GER, grazie alla capacità di definire con precisione molte caratteristiche degli episodi di reflusso.

La pH-impedenziometria, in ambito neonatologico, risulta particolarmente utile nelle fasi di ipoacidità gastrica, mentre l'utilizzo esclusivo del monitoraggio pHmetrico determinerebbe la perdita della maggior parte dei reflussi non acidi<sup>66</sup>. Questa metodica, ha consentito di indagare la correlazione tra episodi di reflusso e sintomatologia respiratoria nei neonati. Poiché la maggior parte degli episodi di reflusso correlabili ad alterazioni respiratorie si realizza nelle ore postprandiali ed è, quindi, di tipo non acido, l'utilizzo esclusivo della pHmetria non risulta adatto al riconoscimento di tutti gli episodi di GER<sup>75</sup>. Per quanto riguarda la correlazione tra GER ed episodi di apnea alcuni autori confermano la correlazione tra apnee e GER<sup>76 63</sup>, mentre altri hanno invece escluso questa relazione<sup>62 58</sup>.

La MII risulta sensibile nel rilevare piccoli volumi di bolo, che possono essere causa di GER nel neonato prematuro<sup>77</sup>: anche un volume liquido di soli 0,1 ml produce le tipiche variazioni impedenziometriche, ad ulteriore conferma della sensibilità della metodica.

## Capitolo 4

### Studio sperimentale

#### 4.1 Premesse

Il latte materno è considerato l'alimento di prima scelta anche per i neonati prematuri, in quanto fornisce componenti nutrizionali unici, contribuisce alle difese immunitarie, esercita un effetto trofico sul tratto gastroenterico e favorisce l'instaurarsi del legame madre-bambino<sup>78</sup>; esso comporta inoltre benefici effetti, ormai ampiamente documentati, sia a breve che a lungo termine, anche nei neonati prematuri<sup>79</sup>. Tuttavia sia il latte materno che il latte di banca forniscono un apporto energetico e di nutrienti essenziali che risulta inadeguato a coprire le maggiori necessità nutrizionali di questa categoria di neonati, ad assicurare una rapida crescita ed uno sviluppo normale, che siano paragonabili a quello che verrebbe raggiunto dallo stesso neonato in utero; tutto ciò comporta un rischio molto elevato di ritardo di crescita intrauterino<sup>2</sup>.

In accordo con l'American Academy of Pediatrics, gli apporti nutrizionali per i neonati prematuri variano per quanto riguarda le proteine da 3,5 a 4 g/kg/die e per quanto riguarda i lipidi da 5,4 a 7,2 g/kg/die<sup>4</sup>. Per raggiungere i fabbisogni nutrizionali il latte materno viene solitamente supplementato con prodotti fortificanti (HFM) costituiti da proteine, carboidrati e minerali, che vengono addizionati al latte materno in quantità standard. Studi recenti documentano che i neonati prematuri alimentati con latte materno fortificato presentano un maggior accrescimento staturale e della circonferenza cranica, senza aumento di effetti avversi, tra cui l'enterocolite necrotizzante (NEC)<sup>25</sup>. Il contenuto proteico e lipidico del latte materno presenta tuttavia un'elevata variabilità sia interindividuale che legata a condizioni quali: l'età

gestazionale, il parto, le settimane del post-parto, nonché le varie fasi del giorno. Risulta quindi difficile coprire efficacemente i fabbisogni nutrizionali dei prematuri fortificando il latte materno in maniera standardizzata<sup>29 30</sup>.

Per sopperire adeguatamente agli elevati fabbisogni nutrizionali dei neonati pretermine, sarebbe auspicabile realizzare un regime di fortificazione personalizzata basato sull'analisi individualizzata della composizione del latte materno. Questa modalità consentirebbe di evitare un'alimentazione troppo povera ma anche un'eccessiva sovralimentazione, e di ridurre al minimo i problemi di tolleranza alimentare legati alla fortificazione<sup>27</sup>.

Infatti è stato dimostrato che l'aggiunta di fortificante al latte materno aumenta l'osmolarità portandola verso valori più elevati rispetto a quello che ci si aspetterebbe basandosi solo sulla composizione del fortificante, inoltre l'osmolarità tende ad aumentare nel tempo<sup>44</sup>. Tale aumento di osmolarità può rallentare lo svuotamento gastrico post-prandiale, essere causa di scarsa tolleranza alimentare e configurarsi quindi come un possibile elemento facilitante il reflusso gastroesofageo nei neonati alimentati con latte materno fortificato<sup>44</sup>.

Il neonato prematuro presenta un elevato rischio di sviluppare reflusso gastroesofageo per una serie di fattori favorevoli che si associano ad un variabile grado di immaturità dell'apparato gastroenterico<sup>48</sup>. Oltre ai fattori fisiologici quali l'immaturità dello sfintere esofageo inferiore (LES), la posizione supina ed il riempimento gastrico con elevati volumi di liquido<sup>52</sup>, anche la composizione del latte può contribuire agli episodi di GER<sup>45</sup>. Poiché la sintomatologia correlata può essere clinicamente rilevante e ritardare la dimissione, l'obiettivo della fortificazione personalizzata dovrebbe identificare un regime alimentare in cui gli apporti riescano a coprire i fabbisogni senza alterare la tolleranza gastrica.

Per l'attuazione di un regime di fortificazione personalizzata, non è possibile prescindere dalla valutazione delle caratteristiche nutrizionali individuali del latte materno. Varie metodiche di laboratorio sono state utilizzate per analizzare il contenuto proteico e lipidico del latte materno.

Tuttavia, la maggior parte di queste metodiche richiedono tempi lunghi di esecuzione e non sono utilizzabili come analisi routinarie nella pratica clinica<sup>80 81</sup>.

La metodica NIRA, costituisce al contrario una metodica semplice e rapida per la determinazione routinaria del contenuto in macronutrienti del latte umano. Infatti, consente una valutazione quantitativa di un'ampia varietà di componenti sia dei materiali solidi che dei liquidi<sup>42</sup> necessita di una minima quantità di materiale (5 ml di latte) ed è estremamente rapida; infatti, in alcuni minuti consente la determinazione del contenuto proteico e lipidico del latte, non necessita di reagenti e la manipolazione del materiale è minima.

Attualmente, non ci sono studi che abbiano valutato l'influenza delle caratteristiche nutrizionali e chimiche del latte materno dopo fortificazione, sul reflusso gastroesofageo (GER) come indice di tolleranza alimentare nel neonato. Appare quindi importante valutare se e in quale misura il contenuto lipidico, proteico e l'osmolarità del latte materno prima e dopo fortificazione possano contribuire al reflusso gastroesofageo nel neonato prematuro sintomatico.

## 4.2 Obiettivi dello studio

Lo studio in oggetto è suddiviso in due fasi, ognuna con specifici obiettivi. Nella prima fase (FASE 1) l'obiettivo primario è quello di valutare l'accuratezza e l'adeguatezza della metodica NIRA per la determinazione del contenuto proteico e lipidico del latte materno. La validazione di una metodica rapida ed accurata che consenta la valutazione della composizione del latte materno risulta di fondamentale importanza per poter eseguire una fortificazione personalizzata in base al contenuto di macronutrienti ed ottimizzare gli apporti nutrizionali per i neonati VLBW. Pertanto questa fase dello studio è stata condotta con i seguenti obiettivi:

Valutare la composizione del latte materno, analizzandone il contenuto in lipidi ed azoto attraverso la metodica NIRA.

Confrontare i risultati ottenuti con i dati laboratoristici delle metodiche tradizionali.

Poiché la fortificazione del latte materno rappresenta un presidio ormai validato nella nutrizione del neonato prematuro, risulta opportuno valutarne il possibile effetto sull'incidenza di GER, in modo tale da identificare quella modalità di fortificazione che consenta il massimo beneficio per la crescita del neonato e, allo stesso tempo, minimizzi gli effetti negativi sul reflusso gastroesofageo, mediante pH-impedenziometria intraesofagea.

Nella seconda fase dello studio (FASE 2) l'obiettivo è stato quindi quello di valutare e confrontare l'effetto dei diversi gradi di fortificazione del latte materno sulle caratteristiche chimico-fisiche del latte stesso e sull'incidenza di GER nel neonato prematuro sintomatico.

### 4.3 Disegno dello studio

#### FASE 1:

Sono stati raccolti 124 campioni di latte di cui 55 campioni da madri di neonati pretermine (età gestazionale: 26-32 settimane) e 69 neonati a termine (età gestazionale 37-41 settimane). Le madri sono state informate dello studio ed hanno dato il loro consenso.

I campioni di latte delle madri dei neonati pretermine ricoverati nella nostra Terapia Intensiva Neonatale sono stati raccolti in decima giornata post-partum, e sono stati estratti dal pool giornaliero.

I campioni di latte delle madri di nati a termine sono stati anch'essi raccolti in decima giornata di vita, in occasione della visita ambulatoriale.

Tutti i campioni, raccolti in contenitori sterili, sono stati suddivisi in due aliquote di cui: 5 ml per la valutazione del contenuto proteico e lipidico tramite

metodica NIRA e 15 ml per l'analisi di laboratorio tramite le metodiche tradizionali.

La valutazione mediante metodica NIRA è stata eseguita nell'apposito locale attrezzato all'interno della Terapia Intensiva Neonatale. L'analisi tramite le metodiche tradizionali è stata eseguita presso un laboratorio specialistico.

La calibrazione e la validazione della metodica sono state effettuate utilizzando campioni di latte materno, e questo aumenta l'accuratezza del metodo. Infatti, benché ogni nutriente presenti la sua specifica banda di assorbimento, il suo spettro di riflettanza è influenzato dagli specifici legami complessi tra i nutrienti.

Per la calibrazione della NIRA (Fenir 8820: Esetek Instrumets, Marino, Roma) sono stati utilizzati gli spettri di assorbimento di 97 campioni di latte materno che hanno costituito il "set di calibrazione". Successivamente sono stati utilizzati gli spettri di assorbimento di altri 60 campioni di latte materno come "set di validazione" per la validazione della metodica.

Il set di calibrazione è stato utilizzato per la creazione di un modello predittivo, attraverso l'analisi di regressione lineare (Proteine:  $y=0,9994x-0,0004$ ;  $R^2=0,4651$ ; grassi:  $y=1,0003x-0,0009$ ;  $R^2=0,8542$ ) Quindi questo modello è stato applicato al set di validazione per verificare la riproducibilità della NIRA rispetto alle metodiche tradizionali di riferimento (Proteine:  $y=0,976x+0,0052$ ;  $R^2=0,6536$ ; grassi:  $y=1,0164x-0,0107$ ;  $R^2=0,8008$ ).

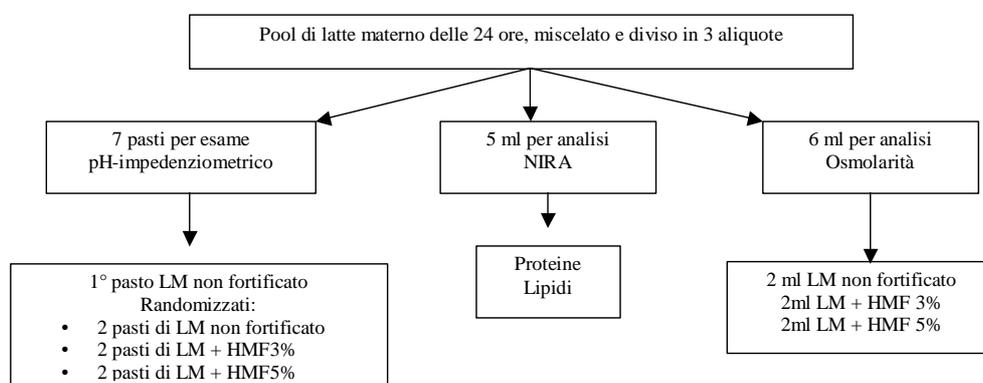
#### FASE 2:

La seconda parte dello studio è stata condotta in maniera randomizzata, non controllata.

Sono stati arruolati 17 neonati prematuri con sintomi indicativi di GER (frequenti rigurgiti e/o desaturazioni post-prandiali); con età gestazionale media di 30 settimane (range 24 e 33 settimane) e peso medio alla nascita di 1265 g (range 580-1745g). Al momento dell'esame presentavano un'età media di 27 giorni di vita (range 12-145 giorni) ed un peso medio di 1690 g (range 1127-1180g). Tutti i neonati erano alimentati con latte materno e a pieno

regime con l'alimentazione entrale (150 ml/kg/die). Come criteri di esclusione sono stati considerati: età gestazionale > 33 settimane; presenza di patologia acuta grave (infezioni, NEC); assunzione cronica di farmaci che potessero interferire con le funzioni motorie dell'apparato gastrointestinale (procinetici) e/o con la secrezione acida dello stomaco (inibitori della pompa protonica, antiacidi, H2-antagonisti).

I genitori dei piccoli sono stati informati e prima dell'esame è stato acquisito il loro consenso scritto. Il disegno dello studio è riassunto nello schema seguente:



Nel giorno designato per l'esame, la mattina presto, il pool delle 24 ore del latte di ogni pretermine, raccolto e conservato è stato ben miscelato e diviso in 3 aliquote.

La prima aliquota è stata utilizzata per l'alimentazione del neonato durante le 24 ore dello studio: in questo periodo ogni neonato è stato sottoposto alla registrazione simultanea con impedenziometria intraluminale e pHmetria (pH-MII)

Durante l'indagine si è seguito uno schema fisso di alimentazione che ha previsto, nelle 24 ore, l'assunzione di 7 pasti, con la stessa quantità fissa di latte; alla fine di ogni pasto i neonati sono stati messi in posizione supina. Tutti i pasti sono stati preparati dalla stessa infermiera.

Per tutti i neonati il primo pasto somministrato è sempre stato costituito da latte materno non fortificato (tale pasto ed il relativo periodo post-prandiale non sono stati considerati ai fini dell'analisi statistica); i successivi sei pasti sono stati suddivisi in 3 coppie: una coppia di pasti costituita da latte materno non fortificato, un'altra da latte materno fortificato al 3%, la terza da latte materno fortificato al 5%.

Il fortificante utilizzato è FM-85, prodotto da Nestlè nella cui composizione di trovano, proteine, maltodestrine, elettroliti e vitamine; ogni g di fortificante contiene 0,2 g di proteine e 3,5 Kcal. La fortificazione del latte materno è stata eseguita immediatamente prima della somministrazione di ogni pasto.

L'ordine di assunzione dei diversi pasti è stato randomizzato per ogni paziente in modo tale che solo l'infermiere addetto alla preparazione ne fosse a conoscenza: in questo modo, si è garantito che la lettura dei tracciati impedenziometrici si svolgesse in cieco.

La seconda aliquota è stata utilizzata per la determinazione dell'*osmolarità*: l'osmolarità del latte materno non fortificato è stata valutata subito dopo la suddivisione delle aliquote, mentre l'osmolarità del latte fortificato (una parte fortificato al 3% e una al 5%) è stata valutata 5 minuti dopo la fortificazione. I valori di osmolarità raccomandati per i neonati non dovrebbero superare 400mOsm/kg<sup>46 82</sup>.

La terza aliquota è stata utilizzata per la valutazione del *contenuto proteico e lipidico* del latte materno non fortificato mediante metodica NIRA. Il contenuto proteico del latte materno dopo fortificazione è stato calcolato aggiungendo l'apporto proteico dato dal fortificante al contenuto proteico misurato del latte materno.

Per rispettare le raccomandazioni sugli apporti<sup>4</sup> i neonati pretermine a full feeding (150 ml/kg) dovrebbero essere alimentati con un latte che garantisca un contenuto proteico da 2,33 a 2,66 g/100 g di latte e un contenuto lipidico da 3,6 a 4,8 g/100 g di latte.

## 4.4 Metodi dello studio

Nella prima fase dello studio (FASE 1) sono stati utilizzati per la calibrazione e validazione della metodica NIRA la stessa metodica NIRA e i metodi di laboratorio per la valutazione del latte materno spiegati di seguito.

Nella seconda fase dello studio (FASE 2) sono stati utilizzati la pH-impedenziometria per la valutazione del reflusso gastroesofageo e la metodica NIRA, dopo calibrazione e validazione, per l'analisi del contenuto del latte materno. La valutazione dell'osmolarità è stata eseguita presso il Nostro laboratorio centralizzato.

### 4.4.1 NIRA (Near-Infrared Reflectance Analysis)

La metodica NIRA (Fenir 8820: Esetek Instrumets, Marino, Roma) si basa sul principio della riflessione delle radiazioni infrarosse da parte dei componenti del campione; nello spettro dell'infrarosso (da 800 a 2500 nm) si individuano gli assorbimenti relativi a molti legami chimici (l'atomo di idrogeno, il carbonile, il doppio legame carbonio-carbonio e il perossidrile): moltissime sostanze organiche ed alcune inorganiche presentano, quindi, bande di assorbimento specifiche in questa regione dello spettro. Nel processo di analisi vengono utilizzati filtri, a lunghezza d'onda selezionata, per l'assorbimento delle sostanze da analizzare. La riflettanza dal campione nelle specifiche bande è correlata alla concentrazione dell'elemento in esame nel campione<sup>83</sup>. E' in grado di consentire la determinazione contemporanea di lipidi, azoto, acqua e carboidrati nei vari campioni in esame.

Dei campioni del pool di latte materno sono state prelevate aliquote da 5 ml che sono stati inseriti nell'apposita cella di misurazione. L'analisi, effettuata rapidamente (1 minuto), ha consentito con la valutazione simultanea del contenuto in azoto e lipidi. Non è sono stati utilizzati reagenti né è stata

necessaria alcuna manipolazione del latte, è infatti sufficiente una rapida omogeneizzazione manuale.

La calibrazione e la validazione della metodica effettuata utilizzando campioni di latte umano aumenta l'accuratezza del metodo. Infatti, benché ogni nutriente presenti la sua specifica banda di assorbimento, il suo spettro di riflettanza è influenzato dagli specifici legami complessi dei nutrienti<sup>84 30</sup>.

#### **4.4.2 Metodiche di laboratorio**

Per la valutazione del contenuto proteico del latte materno la metodica tradizionale utilizzata è il Metodo Kjeldahl, mentre per i lipidi è il metodo Gerber.

Il metodo Kjeldahl, che consente la determinazione dell'azoto totale, utilizza la digestione acida in presenza di un catalizzatore al selenio che si verifica ad elevate temperature (370°C). L'Ammonio che si libera durante questa procedura è quindi quantificato con un metodo colorimetrico<sup>80</sup>.

Il metodo Gerber per i lipidi si avvale di un apposito tubo graduato (tubo di Gerber) in cui vengono mescolati specifici volumi di latte ed acido sulfurico; l'acido sulfurico dissolve le proteine del latte ed i carboidrati. I globuli di grasso, più leggeri, vengono separati tramite centrifugazione. Il contenuto lipidico viene quindi automaticamente valutato nel tubo graduato. Per favorire la formazione di una colonna lipidica omogenea si utilizzano aggiunte di alcool<sup>81</sup>.

#### **4.4.3 pH-impedenziometria**

La pH-impedenziometria consente il rilevamento sia dei reflussi acidi che di quelli non acidi; pertanto, essa risulta di grande utilità nello studio del neonato prematuro in cui, per le peculiari modalità di alimentazione, il pH gastrico risulta tamponato per un tempo prolungato<sup>70 54</sup>. Per l'esecuzione degli esami è

stato utilizzato un unico dispositivo multicanale intraluminale per la rilevazione dell'impedenza e del pH. (Sandhill Scientific Inc, Highland Ranch, USA). Prima di ogni esame si è proceduto alla calibrazione del sensore di pH utilizzando soluzioni a pH 4 e successivamente a pH 7. Il sondino pH-impedenziometrico utilizzato è di tipo flessibile, monouso presenta un diametro esterno di 1,5 mm. E' costituito da sette elettrodi impedenziometrici circolari posti a costituire 6 canali bipolari d'impedenza ed un elettrodo di antimonio sensibile alle variazioni di pH. La distanza di 1,5 cm tra un elettrodo e l'altro ha permesso di ottenere informazioni su una lunghezza complessiva di 9 cm. Il sondino è stato, quindi, introdotto per via nasale nel lume esofageo, per una lunghezza precedentemente calcolata mediante la formula di Strobel<sup>54</sup> in modo che i canali d'impedenza si trovino posizionati nel tratto di lume compreso tra la zona appena sopra il cardias (canale 6) e il faringe (canale 1), con il sensore pHmetrico situato a livello del canale 6 (al centro del dipolo impedenziometrico distale), approssimativamente 1,5 cm sopra la giunzione gastroesofagea. La verifica del corretto posizionamento del sondino è stata effettuata mediante analisi radiologica. I dati relativi alle variazioni di impedenza e di pH ad una frequenza di 50 Hz per ogni canale di registrazione sono stati acquisiti e memorizzati su una scheda di memoria removibile (Sleuth<sup>®</sup> Sandhill Scientific). Dopo 24 ore dall'inizio della registrazione, la pH-impedenziometria è stata spenta, il sondino estratto, e i dati presenti sulla memoria removibile sono stati trasferiti al calcolatore e analizzati mediante un apposito software (BioVIEW Analysis<sup>®</sup> Sandhill 5.3.4)

L'impiego della MII ha permesso di riconoscere il transito di materiale nel lume esofageo indipendentemente dal valore di pH, di distinguerne la direzione e la natura fisica, di evidenziare l'altezza raggiunta del materiale refluito e di ottenere informazioni riguardo alla durata dei reflussi. La simultanea registrazione pH-metrica ha consentito, inoltre, di distinguere la natura chimica di ogni episodio di reflusso attraverso la misurazione della differenza di potenziale elettrico tra il sensore di pH posizionato nel lume esofageo ed un elettrodo di riferimento sulla cute del paziente.

Gli episodi di reflusso sono stati diagnosticati sulla base del riconoscimento del tipico andamento di impedenza che li caratterizza: un calo del valore di impedenza di almeno il 50% del valore basale, che si verifichi in almeno due canali consecutivi e con andamento retrogrado, cioè interessando per primo il canale più distale.

Grazie all'apposito software è stato possibile ottenere, per ogni bambino sottoposto alla registrazione, un elenco di tutti gli episodi di reflusso in ordine di registrazione e, per ogni reflusso, la seguente serie di informazioni:

- Orario in cui si è verificato il reflusso.
- Natura fisica del reflusso (reflusso liquido, misto, gassoso).
- Natura chimica del reflusso (reflusso acido, debolmente acido, debolmente alcalino).
- Altezza raggiunta dal materiale refluito.
- Durata del reflusso.

La durata del reflusso è stata definita come il tempo necessario affinché, nel canale più distale (canale 6), il valore d'impedenza tornasse al 50% del valore iniziale, dopo il calo dovuto al passaggio del materiale refluito; ciò corrisponde ad una clearance di più del 90% del volume di materiale refluito.

Con l'aiuto dei genitori dei neonati e del personale infermieristico, è stato compilato un diario che raccogliesse informazioni relative alle 24 ore di registrazione. Sul diario sono stati annotati, per ogni pasto e relativo periodo postprandiale, i seguenti dati:

- Il numero del pasto riportato sul biberon.
- L'orario di inizio e di fine pasto (che è stato registrato anche sull'impedenzio-pHmetro).
- Il livello di accettazione del pasto.

In base all'orario in cui si sono verificati gli episodi di reflusso e all'orario dei pasti riportato sul diario, è stato possibile distinguere il numero e il tipo di reflussi relativi ad ogni periodo postprandiale. Solo a questo punto è stata rivelata la composizione dei singoli pasti assunti da ciascun bambino.

Per ogni bambino è stata approntata una tabella riassuntiva in cui sono stati inseriti i dati relativi sia agli episodi di reflusso sia alle determinazioni delle caratteristiche chimico-fisiche del latte. I dati sono stati quindi valutati allo scopo di valutare le possibili relazioni tra fortificazione del latte materno e reflusso gastroesofageo.

Come già descritto<sup>54</sup> gli episodi di GER vengono individuati a due diverse altezze dal sistema pH-metrico e dall'impedenziometria e più precisamente: gli episodi di GER vengono individuati dal pH-metro circa 1,5 cm al disopra del LES, mentre il bolo che si muove in direzione retrograda deve raggiungere per lo meno il 2° dipolo impedenziometrico distale, a circa 4,5 cm al disopra del LES, per poter essere individuato dall'impedenziometro.

Un episodio di GER è definito “acido” quando il pH è  $<4$  e “non acido” quando il pH è  $\geq 4$ <sup>73</sup>. La percentuale complessiva di tempo in cui l'esofago è esposto a valori di  $\text{pH} < 4$  viene definita Indice di Reflusso (RIpH). La percentuale complessiva di tempo in cui l'impedenziometro individua episodi di GER nell'esofago viene indicata come bolus exposure index (BEI), e successivamente separata in indice di reflusso acido (aMII-GER-BEI) e non acido (NaMII-GER-BEI).

#### **4.4.4 NIRA**

La valutazione del contenuto proteico e lipidico delle apposite aliquote di latte materno di ogni bimbo esaminato, è stata utilizzata la metodica NIRA, calibrata utilizzando latte materno e validata nella prima parte dello studio.

#### **4.4.5 Valutazione dell'osmolarità**

L'osmolarità è stata valutata, presso il Nostro laboratorio centralizzato, utilizzando un osmometro crioscopico (OM 6030), attraverso la valutazione dell'abbassamento del punto di congelamento di campioni di 60 $\mu\text{l}$ ., con una

riproducibilità inferiore all'1%. Tutti i campioni sono stati analizzati in cieco dagli operatori.

## 4.5 Analisi statistica

### FASE 1

Per testare la concordanza tra la metodica NIRA e le metodiche tradizionali (Kjeldahl per le proteine e Gerber per i lipidi) è stato utilizzato il metodo Bland e Altman con i diagrammi di Bland -Altman (Med Calc 9.3.9.0, Med Calc Software).

Per valutare le differenze tra i campioni di latte materno delle madri dei neonati pretermine ed a termine è stato utilizzato il t test per variabili indipendenti (SPSS 13.0 per Windows) considerando un  $p \leq 0,05$  come statisticamente significativo.

### FASE 2

L'indice di reflusso misurato dopo i pasti di latte materno e di latte materno fortificato sono stati comparati con il test di Friedman. La correlazione tra il contenuto proteico e lipidico del latte materno e l'indice di reflusso sono stati valutati tramite il test di correlazione di Spearman, così come la correlazione tra i valori di osmolarità e gli indici di reflusso. Un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## Capitolo 5

### Risultati sperimentali

#### 5.1 Analisi dei dati

Nella prima fase dello studio (FASE 1) sono stati analizzati i dati riguardanti:

- Calibrazione e validazione della metodica
- Analisi delle caratteristiche del latte materno

##### **5.1.1 Accuratezza della metodica NIRA**

Dall'analisi dei dati è emersa l'estrema accuratezza del dosaggio di lipidi ed azoto, eseguita tramite metodica NIRA, rispetto alle metodiche tradizionali.

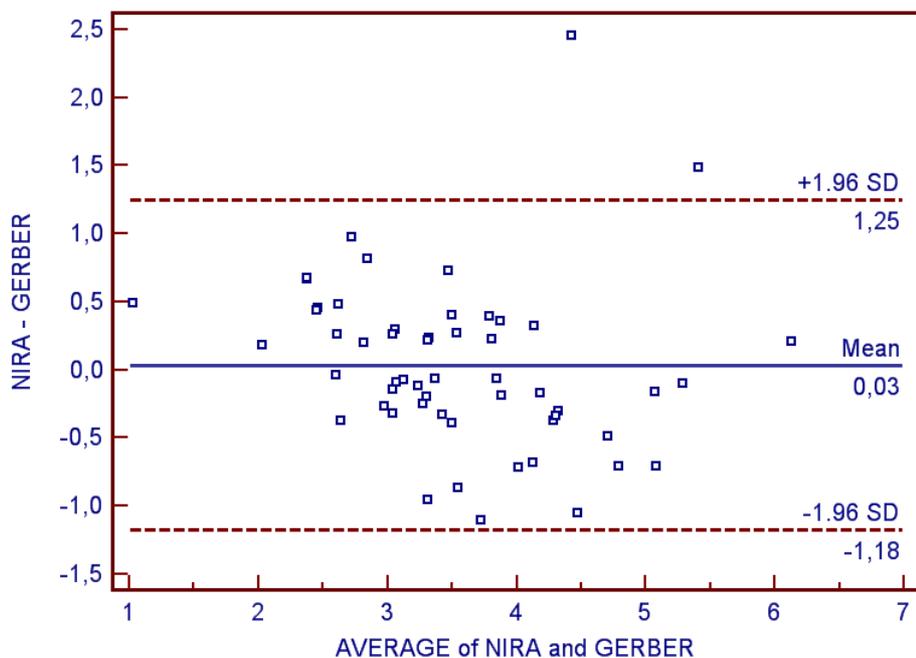
Nella tabella 1 vengono mostrati i valori medi (SD) ed i range dei livelli di azoto e lipidi dosati nei campioni di latte delle madri di neonati pretermine e a termine, dosati con la metodica NIRA e con le metodiche tradizionali (Kjeldahl, Gerber).

I diagrammi 1 e 2 mostrano il contenuto di azoto e lipidi dei latti pretermine e a termine dosati con la NIRA e le metodiche tradizionali, rispettivamente Gerber per il contenuto lipidico e Kjeldahl per il contenuto azotato. In entrambi la differenza tra le metodiche è plottata verso la loro media. La differenza media è tra -0,04 e + 0,03; inoltre la maggior parte dei valori singoli è all'interno del range  $\pm 1$  DS, questo dato evidenzia l'eccellente precisione della NIRA paragonata alle metodiche tradizionali.

Figura 1:

Diagramma Bland-Altman mostra la concordanza tra la metodica NIRA e le metodiche tradizionali (Gerber per il contenuto lipidico [A] e Kjeldahl per il contenuto azotato [B]) nell'analisi del contenuto dei campioni di latte di madri di neonati pretermine

[A]



[B]

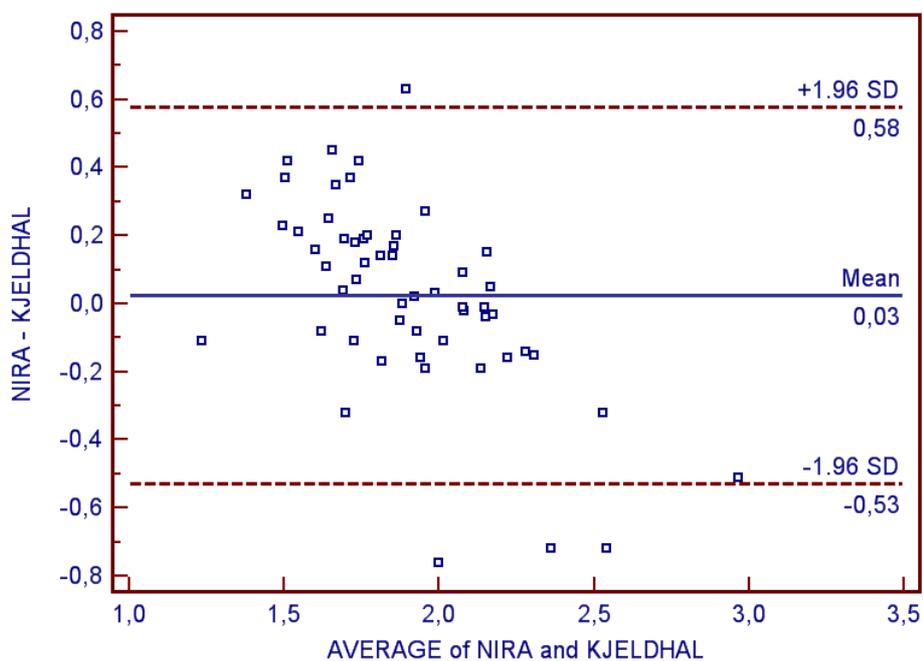
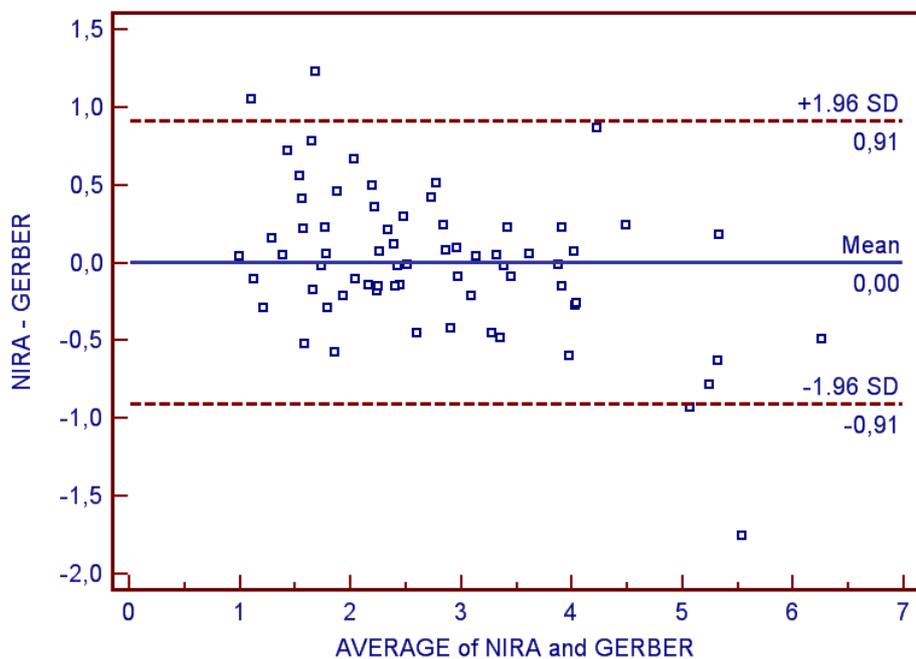


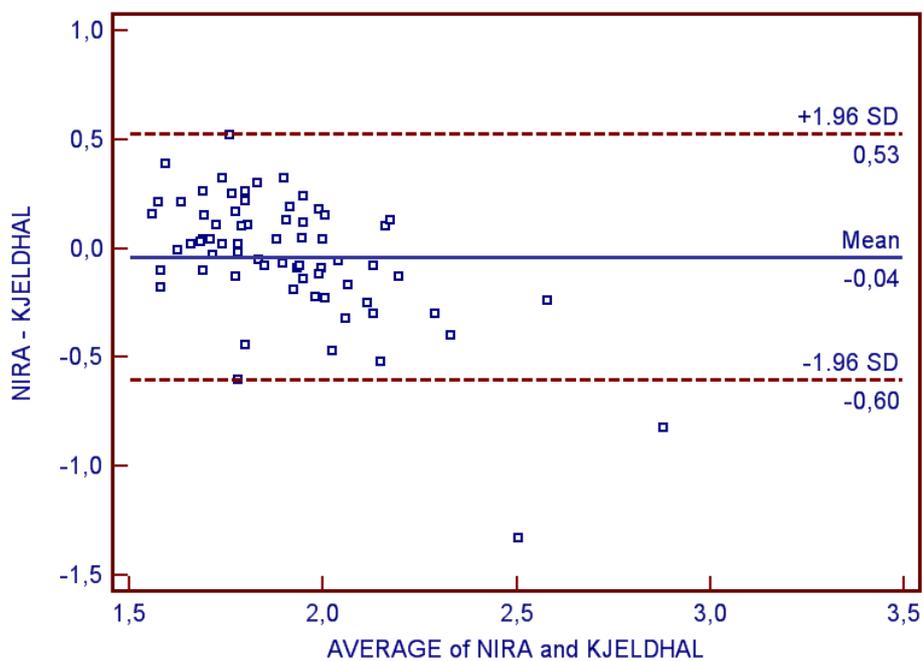
Figura 2:

Diagramma Bland-Altman mostra la concordanza tra la metodica NIRA e le metodiche tradizionali (Gerber per il contenuto lipidico [A] e Kjeldahl per il contenuto azotato [B]) nell'analisi del contenuto dei campioni di latte di madri di neonati a termine

[A]



[B]



### 5.1.2 Valutazione della composizione del latte materno

Dall'analisi del latte materno eseguita tramite metodica NIRA è emerso che il contenuto azotato dei campioni di latte delle madri di neonati prematuri varia da 1,18g/100 g di latte a 2,71g% (mediana 1,88g%; range interquartile 1,75-2,08g%), mentre il contenuto lipidico varia da 1,27 % a 6,23g% (mediana 3,3g%; range interquartile 2,94-4,01g%).

Il contenuto azotato nei campioni di latte delle madri di neonati a termine varia da 1,48g/ % a 2,47g% (mediana 1,89g%; range interquartile 1,77-1,99g%), mentre il contenuto lipidico varia da 1,01g% a 6,01g% (mediana 2,44g%; range interquartile 1,83-3,41g%).

La variabilità è più pronunciata per i lipidi che per l'azoto, sia nei pretermine (rapporto range interquartile:mediana per i lipidi è 0,32 mentre per l'azoto è 0,17) che nei neonati a termine (rapporto range interquartile:mediana per i lipidi è 0,65 mentre per l'azoto è 0,12). Il latte delle madri che hanno partorito prematuramente mostra un contenuto lipidico (media 3,56g%) significativamente più elevato ( $p < 0,001$ ) rispetto al latte di madri a termine (media 2,76g%). Non ci sono differenze significative per quanto riguarda il contenuto proteico, con una media di 1,91g% nel latte di madri che hanno partorito prematuramente e di 1,88g% nei latti degli a termine.

Tabella 1: Valori di azoto e lipidi valutati con la metodica NIRA e con le metodiche tradizionali nei campioni di latte di madri di neonati pretermine e di neonati a termine

	n°	AZOTO			LIPIDI		
		NIRA	Kjeldhal	Pearson corr.	NIRA	Gerber	Pearson corr.
PRETERMINE	55	1.91 ± 0.25 (1.18-2.71)	1.89 ± 0.41 (1.22-3.22)	r= 0.739 p= 0.000	3.56 ± 0.93 (1.27-6.23)	3.52 ± 1.03 (0.78-6.02)	r= 0.806 p= 0.000
TERMINE	69	1.88±0.19 (1.48-2.47)	1.92 ± 0.35 (1.4-3.29)	r= 0.569 p= 0.000	2.76 ± 1.13 (1.01-6.01)	2.76 ± 1.33 (0.58-6.5)	r= 0.942 p= 0.000

Valori espressi in g/100 g di latte. (Media ± DS, range).

Nella seconda fase dello studio (FASE 2) sono stati analizzati i dati riguardanti:

- Valutazione delle caratteristiche del latte materno: concentrazione proteica, lipidica, osmolarità
- Incidenza e caratteristiche del Reflusso Gastroesofageo
- Influenza della composizione del latte materno sul Reflusso Gastroesofageo

### 5.1.3 Utilizzo della metodica NIRA validata

L'analisi del latte materno eseguita mediante metodica NIRA ha confermato l'ampia variabilità del contenuto proteico e lipidico del latte materno. Il contenuto proteico dei 17 campioni non fortificati varia da 1,2 a 1,92 g/100 g di latte (mediana 1,7 g%) e il contenuto lipidico varia da 3 a 6 g% (mediana 4,96 g%). Non è stata trovata nessuna correlazione tra il contenuto proteico e lipidico del latte materno.

I valori di osmolarità del latte non fortificato variano tra 267 e 330mOsm/kg (mediana 298). Dopo fortificazione, al dosaggio standard del 3% di FM85, il contenuto proteico raggiunto dai campioni di latte materno varia da 1,8 a 2,52 g%. Il contenuto proteico presenta quindi un valore al disotto dei 2,33 g% in 11/17 campioni; mentre per nessun campione è stato individuato un contenuto proteico superiore ai 2,666g%. L'osmolarità varia tra 285 e 405mOsm/kg (mediana 347), un solo campione presenta valori di osmolarità superiore ai 400 mOsm/kg.

Dopo fortificazione, al dosaggio standard del 5% di FM85, il contenuto proteico raggiunto dai campioni di latte materno varia da 2,2 a 2,92 g%. Solo un campione raggiunge un contenuto proteico al disotto dei 2,33 g%. Mentre il contenuto proteico si presenta con valori al disopra dei 2,66 g% in 10/17 campioni. L'osmolarità varia tra 315 e 438 mOsm/kg (mediana 407), ed è superiore ai 400 mOsm/kg in 9/17 campioni.

#### 5.1.4 GER e latte materno prima e dopo fortificazione

La pH-impedenziometria (pH-MII) è stata ben tollerata da tutti i pazienti, e la posizione del dispositivo di rilevazione non ha subito modifiche nei pazienti nel corso di nessun esame. Gli indici di reflusso misurati nei 17 pazienti durante i pasti di latte materno e durante quelli di latte materno fortificato sia al 3% che al 5% sono rappresentati nella tabella N 2:

Tabella 2. Indici di reflusso. I valori sono espressi in mediana (range).  $p < .05$  è considerato statisticamente significativo

	LM	LM + HMF 3%	LM + HMF 5%	p
<b>GERs Acidi (n°)</b>	13 (1-50)	29 (1-40)	11 (1-47)	NS
<b>GERs Non Acidi (n°)</b>	8 (1-24)	13 (0-53)	13 (3-74)	0.01
<b>GERs* Total (n°)</b>	28 (4-58)	34 (4-76)	28 (9-93)	NS
<b>RIpH (%)</b>	4.09 (0.01-56.08)	5.59 (0.05-29.23)	5.69 (0.38-46.83)	NS
<b>aMII-GER-BEI (%)</b>	0.19 (0.00-2.19)	0.60 (0.00-1.81)	0.33 (0.00-4.05)	NS
<b>NaMII-GER-BEI (%)</b>	0.68 (0.04-4.48)	1.08 (0.28-10.36)	1.27 (0.14-5.08)	0.028
<b>Altezza del GER (cm dal LES)</b>	3.20 (2.59-7.50)	3.59 (2.25-5.83)	3.94 (2.65-5.84)	0.008

LM = latte materno; HMF = fortificante del latte materno; GER = reflusso gastroesofageo; RIpH = Reflux Index; aMII-GER-BEI = acid bolus exposure index; NaMII-GER-BEI = non acid bolus exposure index; LES= sfintere esofageo inferiore. \* total GERs comprendono gli episodi di GER individuate sia dalla MII che dalla pH metria

Non è stata individuata nessuna differenza significativa tra le tre tipologie di pasto, né per quanto riguarda il numero degli episodi di reflusso acido, né per gli indici di reflusso (RipH,) né per il Bolus-exposure-index acido (aMII-GER-BEI).

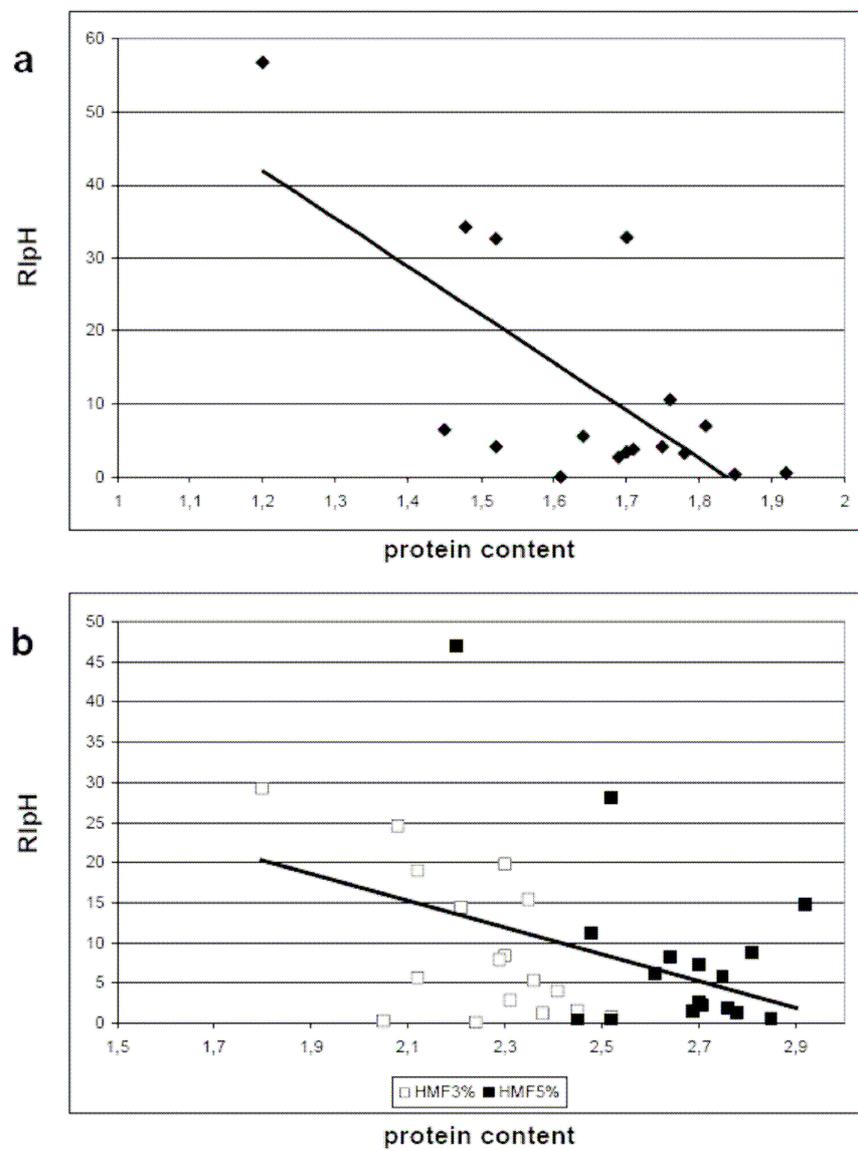
Al contrario, dopo fortificazione, è stato individuato un aumento significativo sia nel numero degli episodi di reflusso non acido ( $p=0,01$ ) che del Bolus-exposure index non acido (NaMII-GER-BEI) ( $p=0,028$ ), così come per l'altezza media raggiunta dagli episodi di GER ( $p=0,008$ ).

Il contenuto proteico e lipidico dei campioni di latte materno valutati attraverso la metodica NIRA e l'osmolarità dopo la fortificazione, sono stati correlati con gli indicatori di GER durante i corrispondenti due consecutivi periodi postprandiali.

E' stata individuata una correlazione inversa significativa tra il contenuto proteico del latte materno non fortificato, il numero degli episodi di GER acido ( $P=0,050$ ,  $\rho=-0,483$ ), e gli indici di reflusso acido (RipH [ $p=0,041$ ,  $\rho=-0,0501$ ]) misurati dopo due pasti con latte materno non fortificato (Fig3a).

Dopo fortificazione, il contenuto proteico del latte materno continua ad essere correlato con RipH anche se non raggiunge valori di significatività (Fig 3b).

Figura 3



Non è stata trovata nessuna correlazione tra il contenuto in lipidi e gli indici di reflusso. Nessuna correlazione è stata inoltre trovata tra i valori di osmolarità, sia prima che dopo fortificazione, e gli indici di reflusso.

## 5.2 Conclusioni

Esiste un'eccellente concordanza tra i valori di lipidi ed azoto valutati attraverso la metodica NIRA e le metodiche laboratoristiche tradizionali (Gerber per il contenuto lipidico e Kjeldahl per il contenuto azotato), sia nei campioni di latte materno dei neonati pretermine che a termine.

Le valutazioni effettuate hanno confermato l'ampia variabilità nel contenuto in macronutrienti del latte materno. In particolare, i campioni di latte delle madri dei neonati pretermine presentano un contenuto lipidico superiore rispetto al latte dei nati a termine, mentre, per quanto riguarda il contenuto proteico, non è stata trovata nessuna differenza significativa tra le due categorie di campioni. L'ampia variabilità nella composizione del latte materno va considerata con particolare attenzione soprattutto per quanto riguarda i neonati pretermine, i cui fabbisogni nutrizionali sono estremamente variabili in base all'età gestazionale, al peso alla nascita, ai giorni di vita e alle condizioni cliniche.

Una nutrizione ottimale è essenziale per la prognosi a lunga distanza dei neonati prematuri. Infatti, benché studi evidenzino come i prematuri alimentati con formule arricchite di proteine presentino una maggiore e più rapida crescita, uno sviluppo superiore a 18 mesi e un quoziente intellettivo superiore a 7,5-8 anni<sup>85</sup>, da studi più recenti emerge un effetto negativo della sovralimentazione nell'infanzia con aumentato rischio di sviluppare patologie cardiovascolari<sup>9 28</sup>. L'alimentazione dei neonati prematuri con il latte materno delle proprie madri presenta maggiori vantaggi rispetto all'alimentazione sia con latti formulati che con il latte di banca<sup>86</sup>. Tra gli effetti benefici dell'alimentazione con latte materno sono riportati una riduzione nell'incidenza di sepsi e di enterocolite necrotizzante: nello specifico l'alimentazione esclusiva con latte materno riduce di 6 volte il rischio di NEC rispetto all'alimentazione con latte artificiale, e la presenza del latte materno nella dieta risulta essere un fattore protettivo anche in regimi di allattamento misto con rischio di sviluppare NEC 3 volte inferiore<sup>21 24</sup>.

Tuttavia sia il latte materno che il latte di banca forniscono un apporto energetico e di nutrienti essenziali che risulta inadeguato a coprire gli elevati fabbisogni nutrizionali di questa categoria di neonati. Per garantire apporti nutrizionali adeguati

si rende pertanto necessario l'utilizzo dei fortificanti. Vista l'elevata variabilità nella caratteristiche organolettiche del latte materno, la mancanza di adeguate informazioni riguardo alla composizione prima della fortificazione, comporta rischi di eccessiva o scarsa concentrazione in nutrienti.

Alla luce di questi dati, piuttosto che un apporto standard di fortificazione, dovrebbero poter essere garantiti apporti proteici ottimali attraverso la valutazione del contenuto azotato del latte materno e variando il regime di fortificazione dopo periodica determinazione dell'azoto ureico (BUN)<sup>27</sup>. Già nel 1993, Polberger e Lonnerdal<sup>26</sup> si prefissero l'obiettivo di migliorare la gestione nutrizionale dei VLBW attraverso una fortificazione individualizzata del latte. Tra i test a disposizione per la valutazione dei macronutrienti del latte materno cercarono un metodo semplice, rapido e poco costoso, e individuarono due metodi adatti ad essere utilizzati in laboratori associati alle NICU (Lowry Protein Assay and Total Lipid Assay). Tuttavia, nonostante questo tentativo fatto più di 10 anni fa la fortificazione individualizzata del latte materno non è mai entrata nella pratica clinica. Tutto ciò è probabilmente dovuto alla difficoltà di individuare test in grado di valutare la composizione del latte materno che siano utilizzabili come determinazioni routinarie delle NICU. I metodi suggeriti infatti sono metodi che necessitano di strutture laboratoristiche e richiedono almeno 4 ore per ogni analisi.

Al contrario la metodica NIRA oltre ad essere uno strumento accurato per la valutazione della composizione del latte materno, risulta facilmente utilizzabile nella pratica clinica routinaria: è infatti uno strumento compatto e sufficientemente piccolo da trovare collocazione all'interno delle NICU, consente un'eccellente precisione nelle determinazioni e costituisce una metodica rapida per la valutazione del contenuto del latte materno. La determinazione contemporanea del contenuto azotato e lipidico viene eseguita in pochi minuti, non richiede reagenti, la quantità di latte e la manipolazione necessaria sono minime.

Per questi motivi può essere utile nella pratica clinica, per migliorare l'approccio nutrizionale dei VLBW, consentendo di assicurare i fabbisogni necessari attraverso il monitoraggio routinario della composizione del latte materno e il raggiungimento di un regime di fortificazione personalizzata ed adattabile al modificarsi delle necessità.

Ad oggi, la fortificazione standard del latte materno è una pratica comune nell'alimentazione del neonato prematuro, raccomandata per garantire loro un adeguato apporto proteico ed energetico<sup>25</sup>.

Tuttavia, nonostante l'ampio utilizzo di fortificanti del latte materno si conosce poco riguardo ai loro effetti sulla funzionalità gastrointestinale. Dopo aver individuato nella metodica NIRA uno strumento accurato ed utilizzabile nella pratica clinica per la valutazione della composizione del latte materno, nella seconda parte dello studio, l'analisi del contenuto proteico e lipidico del latte è stata utilizzata per individuare gli effetti di differenti regimi di fortificazione sulla tolleranza alimentare, e nello specifico sull'entità del reflusso gastroesofageo.

Come era prevedibile, nella seconda fase del nostro studio è stata confermata l'elevata variabilità del contenuto proteico e lipidico del latte materno. Il contenuto proteico del latte non fortificato è risultato inversamente correlato agli indici di reflusso acido: i neonati alimentati con latte materno a maggior contenuto proteico mostrano indici di reflusso più bassi. Parallelamente, gli indici di reflusso acido più elevati sono stati misurati in quei neonati alimentati con latte a più basso contenuto proteico. Non è stata individuata nessuna correlazione tra gli indici di GER ed il contenuto lipidico del latte non fortificato.

Dopo fortificazione si assiste ad un peggioramento dei reflussi non acidi. Un ulteriore dato emerso è che, oltre al peggioramento dei reflussi non acidi, dopo fortificazione alla dose standard del 5%, il contenuto proteico del latte materno supera gli apporti raccomandati nella maggior parte dei campioni.

Non è stata individuata nessuna correlazione tra gli indici di GER e osmolarità sia prima che dopo fortificazione, tuttavia dopo fortificazione l'osmolarità supera i livelli consigliati per i neonati.

Studi che si siano focalizzati sull'effetto della fortificazione sulla tolleranza alimentare e lo svuotamento gastrico nei neonati prematuri sono pochi ed hanno portato a risultati contraddittori. Ewer e coll. hanno dimostrato che l'aggiunta di fortificante al latte materno rallenta significativamente lo svuotamento gastrico se paragonato al latte materno non fortificato<sup>31</sup>. Al contrario, altri studi hanno evidenziato l'assenza di effetti di rallentamento sulla motilità gastrica dopo aggiunta di due differenti tipi di fortificante<sup>32 33</sup>.

Studi su giovani adulti hanno valutato l'effetto della densità calorica e dello specifico ruolo della natura delle calorie sul livello di svuotamento gastrico nei soggetti sani. E' stato evidenziato una relazione lineare tra la densità calorica delle soluzioni e il livello di svuotamento gastrico, e che l'osmolarità influenza lo svuotamento gastrico, anche se solo se per soluzioni ad alti livelli di tonicità. Il tipo di calorie non ha invece effetto sullo svuotamento gastrico<sup>87</sup>.

Questi dati contrastanti sullo svuotamento gastrico non contribuiscono a chiarire i nostri studi sulla correlazione tra reflusso gastroesofageo e contenuto proteico del latte materno. La relazione tra svuotamento gastrico e reflusso gastroesofageo nei neonati prematuri è stato recentemente negata<sup>53</sup>. Nel nostro studio non è stata individuata nessuna correlazione tra gli indici di GER ed il contenuto lipidico del latte umano che si ritiene rallenti lo svuotamento gastrico<sup>34</sup>. A tutt'oggi non ci sono dati sull'effetto del contenuto proteico dei pasti sul reflusso gastroesofageo.

Il nostro studio è il primo a dimostrare uno specifico effetto del contenuto proteico del latte materno sul reflusso gastroesofageo nel neonato prematuro. L'ampia variabilità del contenuto del latte materno è già stata documentata<sup>30</sup>. La mancanza di indicazioni precedenti alla fortificazione sulla composizione dello specifico latte materno può portare ad ovvi rischi di scarsa o eccessiva nutrizione: aggiungendo infatti al latte materno una quantità fissa di proteine si rischia di fornire ad un certo gruppo di neonati un eccessivo carico proteico, rispetto ai fabbisogni raccomandati come limite superiore per il fabbisogno proteico, mentre per altri neonati il rischio è di garantire un apporto inferiore a quello auspicabile.

Per questa ragione molti autori suggeriscono di tarare la fortificazione sulla base della composizione del latte materno<sup>26</sup> e di considerare l'azoto ureico, come indice per l'adeguatezza dell'intake proteico<sup>27</sup>.

Il nostro studio evidenzia la presenza di una relazione inversa tra il contenuto proteico del latte materno non fortificato e il reflusso gastroesofageo acido nel neonato prematuro. Dopo l'aggiunta di fortificante si assiste ad un aumento degli indici di reflusso non acido e, per fortificazioni al 5%, in molti campioni di latte si raggiunge una concentrazione proteica superiore ai limiti raccomandati. L'osmolarità poi può aumentare in maniera importante, raggiungendo valori che sono considerati fattori di rischio per l'enterocolite necrotizzante<sup>82</sup>. Ne consegue che l'aggiunta di una

quantità standard di fortificante al latte umano, non preceduta da valutazioni della composizione di base del latte materno può essere potenzialmente dannosa.

Un fattore limitante di questo studio è che la pH-impedenziometria non è in grado di individuare i reflussi non acidi limitatamente all'esofago distale: perciò non siamo in grado di determinare né la prevalenza dei reflussi non acidi "short" né l'effetto del contenuto proteico su questo tipo di GER. Inoltre, questi dati preliminari sono ricavati da un campione relativamente piccolo e necessitano di essere confermati da trial clinici più ampi. L'effetto del contenuto proteico del latte materno sul reflusso gastroesofageo potrebbe essere secondario ad uno svuotamento gastrico più lento in relazione ad un effetto individuale dell'alimento, ma sfortunatamente il nostro studio non è stato tracciato specificatamente per investigare il ruolo patogenetico di queste variabili.

In conclusione, è stato dimostrato che il contenuto del latte materno prima e dopo fortificazione può influenzare il reflusso gastroesofageo nei nati pretermine. Inoltre la fortificazione standard può peggiorare gli indici di GER non acido e, vista l'estrema variabilità della composizione del latte materno, l'intake proteico raccomandato e l'osmolarità possono venire superati. Per questa ragione dei neonati prematuri alimentati con latte materno o di banca sarebbe auspicabile un regime di fortificazione individualizzata. Tuttavia sono necessari ulteriori trial clinici per valutare come la fortificazione individualizzata possa ottimizzare sia gli apporti nutritivi che la tolleranza alimentare.

---

## Bibliografia

<sup>1</sup> Ernst K. D., Radmacher P. G., Rafail S. T., Adamikin D. H.: *Postnatal malnutrition of extremely low birth weight infants with catch up growth postdischarge* J Perinatol; Sept 2003; 23 (6) 477-482

<sup>2</sup> Clark R. H., Wagner C. L., R. J. Merritt, Bloom B. T., Neu J., Young T. E., Clark D. A.: *Nutrition in the neonatal intensive care unit: How do we reduce the incidence of extrauterine growth restriction?* J Perinatol 2003; 23: 337-344

<sup>3</sup> Embleton N. E., Pang N., Cooke R. J.: *Postnatal malnutrition and growth retardation: an inevitable consequence of current recommendations in preterm infants?* Pediatrics 2001 Feb;107 (2): 270-273

<sup>4</sup> Kashyap S.: *Enteral intake for very low birth weight infants: what should the composition be?* Semin Perinatol. 2007 Apr;31(2):74-82.

<sup>5</sup> Olsen I. E., Richardson D. K., Schmid C. H., Ausman L. M., Dwyer J. T.: *Intersite differences in weight growth velocity of extremely premature infants.* Pediatrics 2002; 110 (6): 1125-1132.

<sup>6</sup> Carlson S. J., Ziegler E. E: *Nutrient intakes and growth of very low birth weight infants.* J Perinatol. 1998; 18: 252-258.

<sup>7</sup> Radmacher P. G., Looney S. W., Rafail S. T., Adamkin D. H.: *Prediction of extrauterine growth retardation (EUGR) in VVLBW Infants* J Perinatol Jul/Aug 2003; 23 (5) 392-395.

<sup>8</sup> Clark R. H., Thomas P., Peabody J.: *Extrauterine growth restriction remains a serious problem in prematurely born neonates* Pediatrics 2003; 111; 986-990.

<sup>9</sup> Casey P. H.: *Growth of low birth weight preterm children;* Semin Perinatol. 2008 Feb;32(1):20-27

- <sup>10</sup> Hack M., Bresaul N., Weissman B., Aram D., Klein N., Borawski E.: *Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age*. N Engl J Med 1991; 325: 231-237.
- <sup>11</sup> Henderson G., Fahey T., McGuire W.: *Calories and protein-enriched formula versus standard term formula for improving growth and development in preterm or low birth weight infants following hospital discharge*. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2005.
- <sup>12</sup> Yu V. Y. H.: *Extrauterine growth restriction in preterm infants: importance of optimizing nutrition in neonatal intensive care units*. Croat Med J 2005; 46 (5) 737-743.
- <sup>13</sup> Tyson J. E., Kennedy K. A.: *Trophic feedings for parenterally fed infants*. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2005
- <sup>14</sup> Hay W. W.: *Strategies for feeding the preterm infant Neonatology*. 2008; 94 (4): 245-254
- <sup>15</sup> Simmer K.: *Aggressive nutrition for preterm infants--benefits and risks*. Early Hum Dev. 2007; 83, 631-634
- <sup>16</sup> Parish A, Bhatia J.: *Early aggressive nutrition for the premature infant*. Neonatology. 2008;94(3):211-214
- <sup>17</sup> Kuzma-O'Reilly B.; Duenas M. L., Grecher C., Kinmberlin, L. Mujsce T., Miller D., Walker D. J.: *Evaluation, development, and implementation of potentially better practices in neonatal intensive care nutrition* Pediatrics 2003,111 (4) 461-470
- <sup>18</sup> Berseth C. L., Bisquera J. A.: *Prolonging small feeding volumes early in life decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants*. Pediatrics 2003
- <sup>19</sup> McGuire W, Bombell S.: *Slow advancement of enteral feed volumes to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants*. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2008

- <sup>20</sup> Henderson G., Anthony M. Y., McGuire W.: *Formula milk versus maternal breast milk for feeding preterm or low birth weight infants*. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2007
- <sup>21</sup> Quigley M. A., Henderson G.: *Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants*. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2007
- <sup>22</sup> Thompson A. M., Bizzarro M. J.: *Necrotizing enterocolitis in newborns. Pathogenesis, Prevention and Management*. Drugs 2008; 68 (9) 1227-38
- <sup>23</sup> Sisk P. M., Lovelady C. A.: *Early human milk feeding is associated with lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants*. J Perinatology 2007, 27 (7), 428-433
- <sup>24</sup> Patole S.: *Prevention and treatment of necrotising enterocolitis in preterm neonates*. Early Human Development 2007, 83(10) 635-642
- <sup>25</sup> Kuschel CA, Harding JE.: *Multicomponent fortified human milk for promoting growth in preterm infants*. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2004
- <sup>26</sup> Polberger S, Riih a NC, Juvonen P, Moro GE, Minoli I, Warm A. *Individualized protein fortification of human milk for preterm infants: comparison of ultrafiltrated human milk protein and a bovine whey fortifier*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999; 29:332-8.
- <sup>27</sup> Arslanoglu S, Moro GE, Ziegler EE.: *Adjustable fortification of human milk fed to preterm infants: does it make a difference?* J Perinatol 2006; 26:614-21.
- <sup>28</sup> Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Kennedy K, Stephenson T, Elias-Jones A, Lucas A. *Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure?* Circulation 2007; 115(2): 213-220.
- <sup>29</sup> Weber A, Loui A, Jochum F, B hrer C, Obladen M. *Breast milk from mothers of very low birthweight infants: variability in fat and protein content*. Acta Paediatr 2001; 90:772-775

- <sup>30</sup> Corvaglia L, Battistini B, Paoletti V, Aceti A, Capretti MG, Faldella G. *Near infrared reflectance analysis to evaluate human milk's nitrogen and fat content in neonatal-intensive care unit*. Arch Dis Child – Fetal Neonatal Ed 2008; 93:F372-F375.
- <sup>31</sup> Ewer AK, Yu VY. *Gastric emptying in pre-term infants: the effect of breast milk fortifier*. Acta Paediatr 1996; 85:1112-1115.
- <sup>32</sup> Gathwala G, Shaw C, Shaw P, Yadav S, Sen J. *Human milk fortification and gastric emptying in the preterm neonate*. Int J Clin Pract 2008; 62(7):1039-43.
- <sup>33</sup> McClure RJ, Newell SJ. *Effect of fortifying breast milk on gastric emptying*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1996; 74: F60-62.
- <sup>34</sup> Siegel M, Krantz B, Lebenthal E. *Effect of fat and carbohydrate composition on the gastric emptying of isocaloric feedings in premature infants*. Gastroenterology 1985; 89:785-790
- <sup>35</sup> Ewer A. K., Durbin G. M., Morgan M. E. I., Booth I. W. *Gastric emptying and gastro-oesophageal reflux in preterm infants*. Arch. Dis. Child. 1996; 75: F117-F121
- <sup>36</sup> Reeves J. B. *Near infrared diffuse reflectance spectroscopy for the analysis of poultry manures*. J. Agric. Food Chem. 2001; 49(5): 2193-2197
- <sup>37</sup> Barton F. E. *Energy from fat determined by near-infrared reflectance spectroscopy*. J. Agric. Food Chem. 2004; 52(6): 1669-1674
- <sup>38</sup> Albanell E., Caja G. *Determination of fat, protein, casein, total solids, and somatic cell count in goat's milk by near infrared reflectance spectroscopy*. J. A.O.A.C. Int. 2003; 86(4): 746-52
- <sup>39</sup> Neucker A. V., Bijleveld C. M. *Comparison of near infrared reflectance analysis of fecal fat, nitrogen and water with conventional methods, and fecal energy content*. Clin. Bioch. 2002; 35: 29-33

- <sup>40</sup> Van den Neucker A. M., Forget P. P. *Lipid, nitrogen, water and energy content of a single stool sample in healthy children and children with cystic fibrosis.* Eur. J. Pediatr. 2003; 162:764-766
- <sup>41</sup> Michaelsen K. F., Pedersen S. B. *Infrared analysis for determining macronutrients in human milk.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1988; 7 (2): 229-35
- <sup>42</sup> Neumeister V., Henker J. *Simultaneous determination of fecal fat, nitrogen, and water by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1997; 25: 388-393
- <sup>43</sup> Corvaglia L., Paoletti V., Battistini B., Simoni P., Faldella G. *Lack of correlation between faecal elastase I levels and faecal nitrogen excretion in preterm infants* J. Pediatr. Gastrol. Nutrition 2008 Oct; 47(5):517-21
- <sup>44</sup> De Curtis M., Candusso M., Pieltain C., Rigo J. *Effect of fortification on the osmolality of human milk.* Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed. 1999; 81: F141–F143
- <sup>45</sup> Salvia G, De Vizia B, Manguso F, Iula VD, Terrin G, Spadaro R., *Effect of intragastric volume and osmolality on mechanisms of gastroesophageal reflux in children with gastroesophageal reflux disease.* Am J Gastroenterol 2001; 96:1725-32.
- <sup>46</sup> Srinivasan L., Bokinić R., King C., Weaver G., Edwards A. D. *Increased osmolality of breast milk with therapeutic additives.* Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed. 2004; 89: 514–517
- <sup>47</sup> Fenton T. R., Belik J. *Routine handling of milk fed to preterm infants can significantly increase osmolality.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2002; 35: 298–302
- <sup>48</sup> Frankaloss G., Burke G., Sanders M. R. *Impact of gastroesophageal reflux on growth and hospital stay in premature infants.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1998; 26: 146-150
- <sup>49</sup> Dhillon AS, Ewer AK.: *Diagnosis and management of gastroesophageal reflux in preterm infants in neonatal intensive care units.* Acta Pediatr 2004; 93:88-93

- <sup>50</sup> Marino A. J., Assing E., Carbone M. T., Hiatt I. M., Hegyi T., Graff M. *The incidence of gastroesophageal reflux in preterm infants*. J. Perinatol. 1995; 15(5): 369-371
- <sup>51</sup> Khalaf M. N., Porat R., Brodsky N. L., Bhandari V.: *Clinical correlations in infants in the intensive care unit with varying severity of gastroesophageal reflux*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2001; 32: 45-49
- <sup>52</sup> Poets CF. *Gastroesophageal reflux: a critical review of its role in preterm infants*. Pediatrics 2004; 113:e128-e132.
- <sup>53</sup> Omari T. I., Rimmel N., Staunton E., Lontis R., Goodchild L., Haslam R. R., Dent J., Davidson G. P. *Paradoxical impact of body positioning on gastroesophageal reflux and gastric emptying in the premature neonate*. J. Pediatr. 2004; 145: 194-200
- <sup>54</sup> Corvaglia L, Rotatori R, Ferlini M, Aceti A, Ancora G, Faldella G. *The effect of body positioning on gastroesophageal reflux in premature infants: evaluation by combined impedance and pH monitoring*. J Pediatr 2007;151(6):591-596
- <sup>55</sup> Noviski N., Yehuda Y. B., Serour F., Gorenstein A., Mandelberg A. *Does the size of nasogastric tubes affect gastroesophageal reflux in children?* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1999; 29: 448-451
- <sup>56</sup> Orenstein R. *Regurgitation & GERD*. J. Pediatr. Gastroenterol. 2001; 32: S16-S18
- <sup>57</sup> Vandenplas Y., Salvatore S., Hauser B. *The diagnosis and management of gastroesophageal reflux in infants*. Early Hum. Devel. 2005; 81: 1011–1024
- <sup>58</sup> Peter C. S., Sprodowski N., Bohnhorst B., Silny J., Poets C. F. *Gastroesophageal reflux and apnea of prematurity: no temporal relationship*. Pediatrics 2002; 109: 8-11
- <sup>59</sup> Slochum C, Hibbs AM, Martin RJ Orestain SR. *Infant apnea and gastroesophageal reflux: a critical review and framework for further investigation*. Curr Gastroenterol Rep 2007; 9:219-24
- <sup>60</sup> Bancalari E. *Apnea is not prolonged by acid gastroesophageal reflux in preterm infants*. Pediatrics 2005; 116:1217-8

- <sup>61</sup> Wenzl TG, Schenke S, Peschgens T, Silny J, Heimann G, Skopnik H. *Association of apnea and non acid gastroesophageal reflux in infants: investigations with the intraluminal impedance technique* *Pediatr Pulmonol* 2001; 31:144-9
- <sup>62</sup> Mousa H, Woodley FW, Metheney, M Hayes J. *Testing the association between gastroesophageal reflux and apnea in infants.* *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41:169-177
- <sup>63</sup> Corvaglia L, Zama D, Gualdi S, Ferlini M, Aceti A, Faldella G.: *Gastroesophageal reflux increase the number of apneas in very preterm infants.* *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008 Sep 11. [Epub ahead of print]
- <sup>64</sup> Emmerson A. J. B., Chant T., May J., Vales P. *Assessment of three methods of pH probe positioning in preterm infants.* *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2002; 35: 69-72
- <sup>65</sup> Omari T. I., Davidson G. P. *Multipoint measurement of intragastric pH in healthy preterm infants.* *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* 2003; 88: F517-F520
- <sup>66</sup> Grant L., Cochran D. *Can pH monitoring reliably detect gastro-oesophageal reflux in preterm infants?* *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* 2001; 85: F155-F158
- <sup>67</sup> Silny J. *Intraluminal multiple electric impedance procedure for measurement of gastrointestinal motility.* *J. Gastrointest. Mot.* 1991; 3(3): 151-162
- <sup>68</sup> Nguyen H. N., Domingues G. R., Winograd R., Koppitz P., Lammert F., Silny J., Matern S. *Impedance characteristics of normal esophageal motor function.* *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 15: 773-780
- <sup>69</sup> Wenzl T. G. *Investigating esophageal reflux with the intraluminal impedance technique.* *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2002; 34: 261-268
- <sup>70</sup> Wenzl T. G., Skopnik H. *Intraluminal impedance: an ideal technique for evaluation of pediatric gastroesophageal reflux disease.* *Pediatr. Gastroenterol.* 2000; 2: 259-264

- <sup>71</sup> Tutuian R., Castell D. O. *Use of multichannel intraluminal impedance to document proximal esophageal and pharyngeal nonacid reflux episodes.* Am. J. Med. 2003; 115(3A): 119S-123S
- <sup>72</sup> Shay S. S., Johnson L. F., Richter J. E. *Acid rereflux.* Dig. Sc. 2003; 48: 1-9
- <sup>73</sup> Sifrim D., Castel D., Dent J., Kahrilas P. J. *Gastro-oesophageal reflux monitoring: review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux.* Gut 2004; 53: 1024-1031
- <sup>74</sup> Balaji N. S., Blom D., DeMeester T. R., Peters J. H. *Redefining gastroesophageal reflux (GER). Detection using multichannel intraluminal impedance in healthy volunteers.* Surg. End. 2003; 17(9): 1380-1385
- <sup>75</sup> Rosen R., Nurko S. *The importance of multichannel intraluminal impedance in the evaluation of children with persistent respiratory symptoms.* Am. J. Gastroenterol. 2004; 99: 2452-2458
- <sup>76</sup> Wenzl T. G., Scenke S., Peschgens T., Silny J., Heimann G., Skopnik H. *Association of apnea and nonacid gastroesophageal reflux in infants: investigation with the intraluminal impedance technique.* Pediatr. Pulmonol. 2001; 31: 144-149
- <sup>77</sup> Peter C. S., Wiechers C., Bohnhorst B., Silny J., Poets C. F. *Detection of small bolus volumes using multiple intraluminal impedance in preterm infants.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2003; 36: 381-384
- <sup>78</sup> Hay WW, Lucas A, Heird W, Ziegler E, Levin E, Grave GD, Catz CS, Yaffe SJ. *Workshop summary: Nutrition of the extremely low birth weight infant.* Pediatrics 1999; 104:1360-1368
- <sup>79</sup> Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, Eidelman AI; American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. *Breastfeeding and the use of human milk.* Pediatrics 2005; 115:496-506
- <sup>80</sup> Keller RP, Neville MC. *Determination of total protein in human milk: comparison of methods.* Clin Chem. 1986; 32(1): 120-123

- <sup>81</sup> Hudson GJ, Gerber H, John PM. *Crematocrit procedure versus triglyceride analysis: a comparison of methods for the determination of human milk fat in epidemiological studies*. J Hum Nutr. 1979; 33 (4): 283-287
- <sup>82</sup> Barnes LA, Mauer AM, Holliday MA, Anderson AS, Dallman PR, Forbes GB et al. *Commentary on breast-feeding and infant formulas, including proposed standards for formulas*. Pediatrics 1976; 57:278-285
- <sup>83</sup> Neumeister V., Henker J. *Simultaneous determination of fecal fat, nitrogen, and water by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1997; 25: 388-393
- <sup>84</sup> Paoletti V., Corvaglia L., Battistini B., Aceti A., Ferlini F., Faldella G. *Valutazione del contenuto proteico e lipidico del latte materno attraverso la metodica NIRA (Near infrared reflectance analysis)* Riv. Med. Perinat. Ed. Spec. Premio Avent 2006; 17-22
- <sup>85</sup> Morley R, Fewtrell MS, Abbott RA, Stephenson T, MacFadyen U, Lucas A. *Neurodevelopment in children born small for gestational age: a randomized trial of nutrient-enriched versus standard formula and comparison with a reference breastfed group*. Pediatrics 2004;113: 515-521.
- <sup>86</sup> Schanler RJ, Lau C, Hurst NM, O'Brain Smith E. *Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants*. Pediatrics 2005; 116 (2): 400-406.
- <sup>87</sup> Calbet JAL, MacLean DA. *Role of caloric content on gastric emptying in humans*. J Physiol 1997; 498:553-559.