

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Direttore: Ch.mo Prof Giorgio Perilongo

U.O.S.D. di Fibrosi Cistica, Ospedale Cà Foncello di Treviso

Direttore: Dott. Mirco Ros

TESI DI LAUREA

ASPERGILLOSI BRONCOPOLMONARE ALLERGICA E COLONIZZAZIONE DA ASPERGILLUS FUMIGATUS IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

RELATORE:

Ch.ma Prof.ssa Liviana Da Dalt

CORRELATORE:

Dott. Mirco Ros, Dott.ssa Isabella Comello

LAUREANDA: Elena Infanti

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
ABBREVIAZIONI	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1 La Fibrosi Cistica	6
1.1.1 Definizioni	7
1.1.2 Epidemiologia	9
1.1.3 Genetica	10
1.1.4 Patogenesi	16
1.1.5 Screening neonatale del portatore	23
1.1.6 Diagnosi	26
1.1.7 Manifestazioni cliniche	31
1.1.8 Terapia	43
1.1.9 Prognosi	57
1.2 Aspergillosi Broncopolmonare Allergica e A. fumigatus	64
1.2.1 Definizioni	65
1.2.2 Epidemiologia	67
1.2.3 Patogenesi	68
1.2.4 Caratteristiche cliniche	71
1.2.5 Diagnosi	73
1.2.6 Terapia	78
2. SCOPO DELLO STUDIO	84
2.1 Obiettivi primari	84
2.2 Obiettivi secondari	84
3. MATERIALI E METODI	85
3.1 Il centro Fibrosi Cistica di Treviso	85
3.2 Etica e richieste regolatorie	85
3.3 Criteri di inclusione/ esclusione e dati trattati	86
3.3.1 Criteri di inclusione	87
3.3.2 Criteri di esclusione	87
3.3.3 Trattamenti permessi	87
3.4 Caratteristiche della popolazione	87

3.5 Tipo e descrizione dello studio	91
3.6 Raccolta ed elaborazione dei dati	91
3.7 Analisi statistica.....	93
4. RISULTATI	95
4.1 Prevalenza di patologie correlate ad <i>A. fumigatus</i>	95
4.2 Dati generali.....	98
4.3 Patologie concomitanti	99
4.4 Funzionalità respiratoria	101
4.5 Cicli antibiotici e steroidei mensili	102
4.6 Colonizzazioni	103
4.7 Trattamenti nell'anno 2021	106
4.8 BMI e z-BMI	107
5. DISCUSSIONE	109
6. CONCLUSIONI	115
7. BIBLIOGRAFIA	117

A Gabriel

La ricerca della verità è più preziosa del suo possesso.

A. Einstein

RIASSUNTO

Presupposti dello studio – La Fibrosi Cistica è una malattia genetica letale la cui complicità maggiore è la malattia polmonare progressiva; il decorso della malattia è caratterizzato da esacerbazioni respiratorie periodiche che sono causate sia da infezioni batteriche che fungine. Per quanto riguarda le infezioni batteriche è noto che la colonizzazione da *P. aeruginosa* abbia un effetto peggiorativo sulla malattia polmonare, mentre la rilevanza clinica delle infezioni fungine, in prevalenza determinate da *A. fumigatus* (AF), rimane tuttora non chiara.

Scopo dello studio - Identificare nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica di età compresa tra i 10 e i 21 anni la prevalenza di colonizzazione da *A. fumigatus*, di sensibilizzazione allergica al fungo, di Bronchite aspergillare e di Aspergillosi Broncopolmonare Allergica (ABPA). In questi gruppi sono stati inoltre analizzati possibili fattori di rischio che facilitano la colonizzazione da AF, la sensibilizzazione agli antigeni fungini e allo sviluppo di ABPA.

Materiali e metodi – Sono stati reclutati 38 pazienti di età compresa tra i 10 anni e i 21 anni regolarmente seguiti presso il Centro Fibrosi Cistica di Treviso. Sono stati estratti dati riguardanti: caratteristiche demografiche, genetica, patologie concomitanti, esami ematici, parametri di funzionalità respiratoria, colonizzazioni, parametri ausometrici, numero di cicli antibiotici e steroidei, e il piano terapeutico di base. I pazienti sono stati suddivisi nei seguenti gruppi: pazienti affetti da ABPA, pazienti sensibilizzati agli antigeni del fungo, pazienti con Bronchite aspergillare, pazienti colonizzati da AF e pazienti senza alcun segno di infezione da AF.

Risultati – Dei 38 pazienti inclusi solo 2 (5,3% del totale) risultano affetti da ABPA, tra i restanti pazienti, 10 appaiono sensibilizzati per gli antigeni di AF (26,4%), 4 pazienti hanno ricevuto diagnosi di Bronchite aspergillare (10,5%) e 2 pazienti sono colonizzati da *A. fumigatus*. 20 soggetti (52,8%) non presentavano alcun segno di infezione da *A. fumigatus*. Tra i pazienti affetti da patologie

correlate all'infezione da AF si è rilevata una frequenza maggiore di insufficienza pancreatica e di colonizzazione da *P. aeruginosa*.

Conclusioni - Questo lavoro ha identificato l'epidemiologia delle varie forme di aspergillosi in FC, ma nel contempo si è scontrato con una scarsa numerosità campionaria che ha messo in luce la necessità di analizzare tali patologie attraverso uno studio multicentrico. Ciò nonostante sono stati individuati alcuni possibili fattori di rischio per la colonizzazione da *A. fumigatus* e lo sviluppo di ABPA quali l'insufficienza pancreatica e la colonizzazione da *P. aeruginosa*.

ABSTRACT

Background - Cystic Fibrosis is a life-limiting disease whose major complication is the progressive lung damage; the course of the illness is characterized by periodic respiratory exacerbations that are caused by both bacterial and fungal infections. With regards to the bacterial infections, the colonization by *P. aeruginosa* is known to have a worsening effect on lung disease, while the clinical relevance of fungal infections, predominantly determined by *A. fumigatus* (AF), still remains unclear.

Objective – To identify in Cystic Fibrosis patients between the ages of 10 and 21 the prevalence of *A. fumigatus* colonization, allergic sensitization to AF, Aspergillus Bronchitis, and Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA). Identification of the risk factors that facilitate AF colonization and lead the colonized patient to subsequently develop sensitization and then ABPA.

Materials and Methods - 38 patients ranging from ages 10 to 21 regularly monitored at the Cystic Fibrosis Centre of Treviso were recruited. Data were extracted regarding: socio-demographic characteristics, genetics, concomitant diseases, blood tests, respiratory function parameters, colonizations, auxometric parameters, number of antibiotic and steroid courses, and baseline treatment plan. The patients were divided into the following groups: patients with ABPA, patients sensitized to fungal antigens, patients with Aspergillus Bronchitis, patients colonized by AF, and patients without any signs of AF infection.

Results - Of the 38 patients included, only 2 (5.3% of the total) were found to have ABPA; among the remaining patients, 10 appeared sensitized to AF antigens (26.4%), 4 patients were diagnosed with Aspergillus bronchitis (10.5%), and 2 patients were colonized by *A. fumigatus*. 20 subjects (52.8%) showed no signs of *A. fumigatus* infection. A higher frequency of pancreatic insufficiency and *P. aeruginosa* colonization was found among patients with AF infection-related diseases.

Conclusions - This work identified the epidemiology of the various forms of aspergillosis in CF, however, it faced a low sample size so it also highlighted the need to analyze these diseases through a multicentre study. Nevertheless, some possible risk factors associated with the colonization by *A. fumigatus* and ABPA development, such as pancreatic insufficiency and colonization by *P. aeruginosa*, were identified.

ABBREVIAZIONI

ABPA – Aspergillosi Broncopolmonare Allergica

AF – Aspergillus fumigatus

AS – Sensibilizzazione agli antigeni aspergillari

BMI – Body Mass Index, indice di massa corporea

CFCC – Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference

CFTR – Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, regolatore della conduttanza transmembrana della Fibrosi Cistica

EMA – European Medicines Agency, agenzia europea del farmaco

FC – Fibrosi Cistica

FDA – Food and Drug Administration

FEV₁ – Forced Expiratory Volume in the 1st second, volume espiratorio massimo nel 1° secondo

FVC – Forced Vital Capacity, capacità vitale forzata

ICS - Inhaled corticosteroids, steroidi inalatori

ISHAM – International Society for Human and Animal Mycology

LABA – long acting beta agonist

MMEF – Maximal Mid-Expiratory Flow, flusso espiratorio forzato

PA – Pseudomonas Aeruginosa

SA – Staphylococcus Aureus

SAMR – Staphylococcus Aureus Meticillino Resistente

SAMS - Staphylococcus Aureus Meticillino Sensibile

1. INTRODUZIONE

1.1 La Fibrosi Cistica

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia multisistemica ereditaria che può manifestarsi a qualsiasi età, e che interessa sia bambini che adulti. Questa patologia a trasmissione autosomica recessiva è la forma genetica letale più comune nelle popolazioni caucasiche¹. La Fibrosi Cistica è causata dalla mutazione di un gene che codifica per un canale epiteliale transmembrana del cloruro, detto “regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica”, CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) la cui funzione, oltre a quella di trasporto del cloro, è di regolare anche altri ioni tra cui il potassio e il sodio. Sono state identificate numerose mutazioni possibili all’interno del gene CFTR, ma tutte portano in modo più o meno marcato ad un aumento della viscosità della sostanza mucosa che viene prodotta dalle ghiandole esocrine.

L’alterazione del gene CFTR colpisce in particolar modo le vie respiratorie superiori e inferiori, le ghiandole sudoripare, il pancreas, il fegato, l’intestino e i dotti deferenti dell’apparato riproduttore maschile determinando secondariamente infezioni respiratorie ricorrenti, insufficienza pancreatica, steatorrea, malnutrizione, cirrosi epatica, ostruzione intestinale e sterilità nell’uomo². Pur rimanendo letale si è riusciti a migliorare notevolmente l’aspettativa e la qualità di vita dei pazienti affetti da questa malattia. Mediante l’introduzione di nuovi protocolli terapeutici, che hanno visto un miglior controllo delle infezioni e dell’uso degli antibiotici, la prognosi dei pazienti è cambiata notevolmente nel corso degli ultimi 30-40 anni passando dall’essere considerata una patologia unicamente pediatrica all’essere maggiormente un disturbo cronico dell’adulto³.

1.1.1 Definizioni

I pazienti affetti da Fibrosi Cistica possono manifestare la patologia in modo molto diverso l'uno dall'altro, infatti, nonostante ad essere colpito risulti lo stesso gene CFTR gli alleli interessati possono essere disparati. Alcuni pazienti ricevono la diagnosi di Fibrosi Cistica alla nascita e la prognosi, in questo caso, è tendenzialmente più infausta. Altri pazienti, ai quali invece viene riconosciuta in età adolescenziale, o adulta, presentano una sintomatologia evidentemente più lieve o atipica.

L'*European Diagnostic Working Group* ha quindi definito una terminologia condivisa in grado di classificare i pazienti come tipici e atipici, e un algoritmo in grado di guidare la diagnosi in modo più rapido e preciso permettendo, soprattutto a questi ultimi, di usufruire del percorso terapeutico più adatto nel minor tempo⁴.

Fibrosi Cistica classica o tipica: i pazienti che fanno parte di questa categoria hanno la concentrazione di cloruro al test del sudore maggiore di 60 mmol/l e anche una o più caratteristiche fenotipiche classiche. I soggetti che rientrano in questa definizione hanno infatti un coinvolgimento cronico dell'apparato respiratorio, del tratto gastro-intestinale associato spesso volte a malnutrizione, un disequilibrio idrosalino e un interessamento dell'apparato riproduttore maschile tale da portare all'azoospermia. La maggior parte dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica rientra in questo gruppo e il loro decorso può risultare severo presentando un rapido peggioramento dei sintomi, oppure in forma meno aggressiva ma con un decorso lento e comunque progressivo⁴. Dai dati del Registro Nazionale CFF (*Cystic Fibrosis Foundation's*) si è potuto evidenziare come il 98% di pazienti affetti da questa malattia faccia parte proprio di questa categoria e ne soddisfi i criteri di appartenenza⁵.

Fibrosi Cistica non-classica o atipica: i pazienti che vengono definiti come tali hanno valori al test del sudore normali (minori di 30 mmol/l) o borderline (tra 30 mmol/l e 60 mmol/l) ma risulta individuabile almeno un organo che presenti il

fenotipo classico Fibrosi Cistica. I soggetti appartenenti a questo gruppo tendenzialmente vengono diagnosticati in età adulta in quanto presentano una malattia polmonare lieve, una funzionalità pancreatica esocrina normale e una fertilità maschile perlopiù regolare. Per la diagnosi di questi soggetti è necessaria, quindi, una conferma mediante l'individuazione di un allele per ciascun gene CFTR, oppure, mediante il riscontro diretto ad un test di misurazione della differenza di potenziale nasale, della disfunzione stessa del canale transmembrana⁴. Alcuni pazienti possono invece avere una presentazione "monosintomatica" della patologia, in particolare è possibile rilevare l'assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti oppure una pancreatite ricorrente a carattere idiopatico che porta quindi alla diagnosi di Fibrosi Cistica partendo da un presupposto diagnostico che origina dall'osservazione di un unico organo classico che viene interessato⁵. Secondo il Registro Nazionale CFF, solo il 2% dei pazienti rientra in questa definizione di malattia, ma con ogni probabilità questo valore risulta sottostimato in quanto la clinica che viene manifestata è talmente lieve e indolente che potrebbe non porre nemmeno il presupposto di indagine per la diagnosi di FC⁵.

Malattie correlate al CFTR: sono state individuate delle entità patologiche che si correlano con il genotipo CFTR; nonostante, non rientrino all'interno dei criteri diagnostici della Fibrosi Cistica e non seguano una trasmissione di tipo mendeliano si è potuta comunque individuare un'associazione. I pazienti affetti da un'alterazione del CFTR hanno un rischio aumentato per ABPA (allergic broncopulmonary aspergillosis), per pancreatiti, per rinosinusiti croniche e per bronchiectasie idiopatiche. È stato evidenziato però come il maggior impatto derivi, non dalla mutazione ma dalle esposizioni ambientali e dai geni non-CFTR⁵.

Sindrome metabolica correlata al CFTR – CRMS (CFTR related metabolic syndrome): sono stati identificati dei soggetti aventi un elevato valore del tripsinogeno allo screening neonatale ma un test del sudore con valori non diagnostici quindi inferiori a 60 mmol/l, i quali avendo anche un test del DNA per la ricerca di mutazione di CFTR inconcludente, sono stati definiti CRMS da parte del comitato medico americano⁶. Questi individui se identificati in età adulta,

possono essere definiti come “FC atipica”, “FC non classica”, “genotipo a basso rischio”, o aventi una “variante lieve di FC”⁷. Essendo però i soggetti considerati ancora neonati, questi dovranno essere necessariamente controllati in modo regolare e continuo dato che potrebbero insorgere differenti alterazioni d’organo, come pancreatiti o infertilità maschile, che in questo modo verrebbero identificati e curati in modo più tempestivo e mirato possibile, al pari dei pazienti caratterizzati come affetti da Fibrosi Cistica⁸. Questa definizione, riguardante quindi un gruppo di soggetti non ben classificati, è stata proposta e accolta dalla comunità medica americana, ma sta faticando invece ad esserlo in Europa e in altri paesi in quanto concepita come poco dirimente nella diagnosi e lasciando troppa incertezza sia al medico che alla famiglia del neonato⁹.

Per un corretto percorso terapeutico che permetta di avere il minor numero di complicanze e la migliore prognosi possibile è fondamentale formulare la diagnosi il più precocemente possibile, auspicando di definirla entro un periodo non superiore ai 2 mesi di vita. Basandosi su questa considerazione quindi, non accettando l’americano CRMS, è stato proposto un nuovo termine CFSPID (*cystic fibrosis screen positive, inconclusive diagnosis*) da parte della ECSF NSWG (*European CF Society, Neonatal Screening Working Up*) che identifica appunto i soggetti che necessitano di una particolare attenzione in attesa di una migliore definizione della loro condizione¹⁰. Sono stati allora presentati dei nuovi modelli di screening per questa quota di pazienti che, permettano di ridurre al minimo possibile questa classe di probabili pazienti¹¹.

1.1.2 Epidemiologia

La prevalenza dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica nella popolazione caucasica è nettamente superiore rispetto ad altre etnie risultando quindi essere la forma genetica più letale. L’incidenza della forma classica, infatti, è di circa 1 caso su 3000 nati tra gli americani caucasici, mentre di 1 caso su 4000-10000 nati in America Latina, e di 1 caso su 15000-20000 tra gli afroamericani. La frequenza di pazienti affetti in Africa e in Asia, invece, è addirittura molto minore, in Giappone si evidenzia 1 caso su 350000 nati¹². In Italia i pazienti affetti da Fibrosi Cistica censiti nel 2020 sono stati 5801 con un incremento di 96 nuove diagnosi dal 2019, e la loro età mediana risultava essere di 22.4 anni¹⁴. L’incidenza in Italia, nelle

regioni in cui si applica lo screening neonatale per la diagnosi di questa patologia, è di 1 caso su 3500 nati e da questo si è riusciti a definire come la prevalenza di portatori sani risulti essere del 4%.

1.1.3 Genetica

La Fibrosi Cistica è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva, quindi due genitori eterozigoti hanno una probabilità di avere un figlio malato del 25%. I dati hanno dimostrato che, tra i portatori della mutazione di CFTR, si ha un aumento della suscettibilità per pancreatiti croniche idiopatiche¹⁶, ma anche per rinosinusiti¹⁷. Il gene mutato alla base di questa patologia è stato scoperto nel 1989¹⁸, e codifica per un canale transmembrana del cloro, costituito da 180000 paia di basi, e da 27 esoni¹¹. È stata condotta un'ampia analisi di linkage che ha evidenziato l'esistenza di un singolo locus nel cromosoma umano 7, nella regione q31¹⁸. La proteina codificata è stata chiamata come il suo gene, CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), ed è costituita da 1480 amminoacidi; la sua funzione in primis è quella di trasporto del cloruro a livello della membrana apicale degli epitelii, ma si è osservato anche avere un ruolo nella regolazione del sodio, del potassio e del bicarbonato. Questo canale è costituito da due domini transmembrana, due domini citoplasmatici e un dominio regolatore¹. La mutazione maggiormente presente tra la popolazione caucasica è sicuramente la Phe508del ($\Delta F508$): si tratta della delezione di tre nucleotidi corrispondenti all'amminoacido fenilalanina [*Phe*] nella posizione 508 che causa un'anomalia nel ripiegamento della proteina. Il 90% dei pazienti caucasici affetti da Fibrosi Cistica presenta almeno una copia del gene con questa mutazione¹⁹. Sono state identificate più di 2000 varianti geniche e molte di queste sono risultate associate casualmente alla malattia².

Sono stati condotti molti studi anche all'interno di gruppi etnici particolari come nella comunità ebraica Ashkenazi in cui si sono osservate cinque diversi tipi di mutazioni. L'ipotesi attualmente più accreditata alla base di questo fenomeno è quella dell'effetto fondatore tale per cui nel 97% dei pazienti si evidenzia almeno una di queste cinque mutazioni ²⁰. In Italia, il 73% dei pazienti affetti da Fibrosi

Cistica presenta almeno una delle 12 mutazioni più frequenti; la più comune è sicuramente F508del, con una frequenza media del 51%, seguita da N1303K e da G542X, entrambe con una media del 5% circa. Non si possono non sottolineare però delle nette differenze all'interno della stessa penisola tra le varie aree geografiche, in Sardegna ad esempio la presenza della mutazione T388I ha una frequenza decisamente rilevante²¹.

Lo studio del gene CFTR sia dal punto di vista molecolare, che dei suoi effetti a livello cellulare, ha portato ad una suddivisione in sette classi delle varie mutazioni in base al difetto funzionale che queste portano, fornendo la base scientifica per una terapia correttiva il più possibile mirata.

- *Classe I – Alterazione della sintesi proteica.* Questa classe è costituita da mutazioni *nonsense*, *frameshift* o *splicing* che portano ad un difetto di biosintesi, dato dalla prematura terminazione dell'mRNA, che porta all'espressione di una proteina CFTR senza alcuna, neppur minima, attività funzionale. L'assenza completa della proteina a livello apicale delle cellule epiteliali si presenta nel 10% dei pazienti affetti nel mondo.
- *Classe II – Alterazione del ripiegamento, dell'elaborazione e del trasporto delle proteine.* Le mutazioni di questa classe portano ad una elaborazione difettosa della catena proteica che viene quindi trattenuta a livello del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi, non completamente ripiegata e glicosilata e degradata da parte del proteasoma prima di raggiungere la superficie cellulare. La mutazione F508del, presente in più dell'85% dei pazienti affetti da FC, fa parte di questa classe.
- *Classe III – Alterazione della regolazione della proteina.* Le mutazioni di questa classe sono definite di “*gating*” in quanto permettono il raggiungimento della proteina a livello apicale, ma ne riducono notevolmente la sua attività prevenendo il legame e l'idrolisi dell'ATP, necessario per il trasporto ionico. La mutazione G551D, facente parte di questa classe, è quella più presente nella popolazione e presenta almeno un allele nel 4-5% dei pazienti al mondo.
- *Classe IV – Ridotta conduttanza.* Le mutazioni di questa classe si manifestano soprattutto a livello del dominio transmembrana CFTR. A

livello apicale le cellule epiteliali presentano un normale numero di proteine mail flusso ionico è ridotto. La mutazione R117H è la più frequente nella popolazione caucasica, e si manifesta con un fenotipo decisamente più lieve rispetto a quello delle classi I, II e III.

- *Classe V – Ridotta quantità.* Le mutazioni facenti parte di questa categoria sono determinate da uno *splicing* anomalo o da un processamento moderatamente ridotto, come nel caso di A455E, e producono una proteina CFTR non alterata, ma in quantità minori rispetto al necessario. L'alterazione viene solitamente rilevata a livello del sito intronico del promotore del gene. Le mutazioni facenti parte di questa classe si manifestano con un fenotipo lieve di malattia.
- *Classe VI – Ridotta stabilità di CFTR.* Il canale CFTR in questa classe risulta destabilizzato sulla superficie cellulare in quanto viene aumentata la sua endocitosi, ma viene anche ridotto il suo ritorno sulla superficie. La mutazione più frequente è 120del23.
- *Classe VII – Unrescuable.* Questa classe è stata proposta solo recentemente e include mutazioni, come larghe delezioni quale ad esempio dele2,3 (21kb), che non rispondono alla terapia con piccole molecole, da cui prendono il nome di “*unrescuable*”. In un prossimo futuro le nuove terapie si propongono di essere “*one-size-fits-all*”, o “a taglia unica”, riuscendo quindi ad adattarsi anche a questa classe^{3, 22-25}.

La suddivisione in sette classi delle differenti mutazioni di CFTR, basata su caratteristiche molecolari ed effetti a livello cellulare, risulta però prettamente teorica, in quanto una ripartizione tanto netta non sempre rispecchia le reali caratteristiche della proteina. La mutazione più frequente della Fibrosi Cistica, ossia F508del, pur facendo parte della classe II in cui si evidenzia un alterato ripiegamento, elaborazione e trasporto di CFTR, presenta anche un alterato gating e un maggior turnover a livello della superficie epiteliale, risultando avere quindi anche caratteristiche della classe III e IV.

La patologia, considerata la differente espressione della proteina CFTR, può presentarsi con un fenotipo più o meno severo. Le classi I, II, III, infatti, si manifestano con una clinica importante, mostrando insufficienza pancreatica, ileo da meconio, malnutrizione, epatopatia e un deterioramento più precoce e severo

della funzionalità polmonare tale da portare ad una morte prematura. I pazienti con mutazioni di CFTR appartenente alle classi IV e V, invece, presentando un fenotipo più lieve, hanno una funzionalità pancreatica conservata, una malattia polmonare lieve, ed una aspettativa di vita maggiore rispetto a quella delle classi precedenti. Le mutazioni delle classi IV e VI infine, hanno un fenotipo dominante e quindi in associazione con mutazioni di classe I, II o III, i pazienti avranno un fenotipo meno severo^{3, 22-25}.

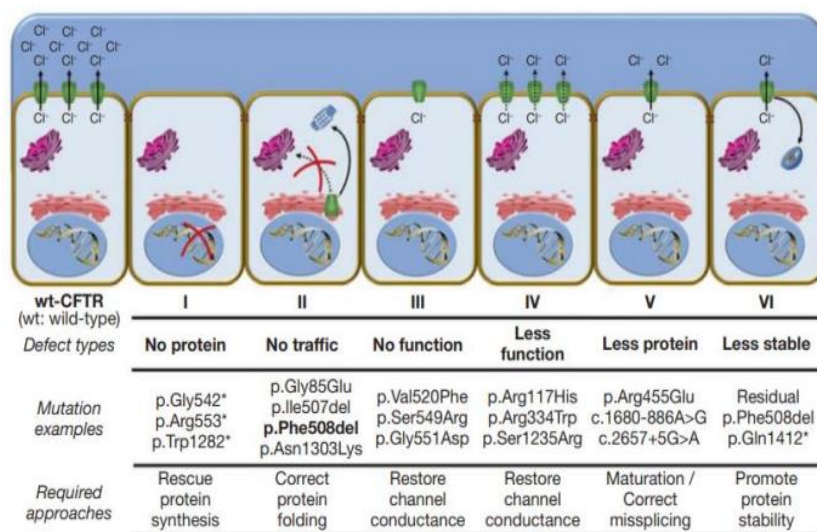


Figura 1 - Classi di mutazioni CFTR, difetti, rispettive mutazioni e terapia correttiva³⁰

Lo studio attento e intenso del genotipo ha la chiara funzione di valutare e definire nel minor tempo possibile il fenotipo dei pazienti, e le complicanze organospecifiche a cui possono essere soggetti. La correlazione tra la malattia pancreatica e le classi più severe di mutazioni è evidente, mentre la possibilità di avere una proteina CFTR, seppur presentante una minore conduttanza, in ridotta quantità o stabilità definisce un fenotipo più lieve che potrebbe essere anche diagnosticato ad un'età più avanzata. I vasi deferenti sono gli organi più sensibili, quindi anche una minima riduzione del funzionamento del regolatore transmembrana CFTR può avere questo fenotipo, a differenza invece dei polmoni in cui questa correlazione è notevolmente ridotta, ma coerente con i polimorfismi genetici e le modificazioni ambientali²³.

I primi studi che sono stati condotti si sono concentrati sulla mutazione più frequente tra i caucasici, ossia F508del, notando come, pazienti con genotipo omozigote, presentavano generalmente un fenotipo organo-specifico più severo

rispetto a coloro che lo avevano eterozigote composto, o a quelli che presentavano altri tipi di mutazioni di CFTR. Inoltre, venne evidenziato come questa alterazione in omozigosi, presentando valori al test del sudore nettamente patologici o un'insufficienza pancreatica, portava alla diagnosi in un tempo minore e a trattamenti e follow-up in età più precoce, se comparata alle altre mutazioni²³.

Nonostante la correlazione tra il genotipo-fenotipo e l'insufficienza pancreatica risulti abbastanza definita, questo non si è potuto osservare nelle manifestazioni polmonari motivo per cui si sono iniziati ad individuare dei cosiddetti “*geni modificatori*”, ossia strutture che potevano influire direttamente sul funzionamento della proteina CFTR o sulla patologia polmonare stessa.

Il *legame mannosio-lectina 2 (MBL2)*²⁶, il *fattore di crescita β (TGF β)*²⁷ e il gene *interferon related development regulator (IFRD1)* sembrano avere delle caratteristiche tali da aumentare la severità, o meno, della patologia in base a determinati polimorfismi che possono venire a presentarsi. I livelli di TGF β , possono essere utilizzati quindi come marker di patologia polmonare, suggerendo il grado di severità della malattia stessa²⁷. Le varianti di questo gene regolano anche la resistenza a infezioni esogene, a cui questi pazienti sono frequentemente soggetti, ritardandone o accelerandone la progressione della storia naturale verso la fibrosi³. È stata anche evidenziata una maggiore correlazione con il rischio di sviluppare asma e BPCO, patologie connesse alla malattia polmonare della Fibrosi Cistica. Varianti del legame mannosio-lectina (MLB) possono associarsi ad una ridotta funzionalità polmonare, ma possono anche definire un aumentato rischio per le infezioni croniche da *P. Aeruginosa* e da *B. Cepacea Complex*, non rare in questi pazienti, e che solitamente si correlano ad una aumentata mortalità²⁶. Sono stati condotti anche diversi studi genome-wide che hanno dimostrato come alcuni polimorfismi siano più o meno correlati ad una forma più severa di Fibrosi Cistica, e di infezioni polmonari. All'interno del cromosoma 11 nella regione p13, infatti è stato individuato un polimorfismo nella regione intergenica EHF (*ETS-homologous factor*, un fattore di trascrizione epiteliale) e APIP (un inibitore dell'apoptosi) che vanno ad influenzare la trascrizione di geni quali EHF, APIP, ma anche PDHX, CD44, ed infine ELF5 che correla, anche con un aumentato rischio di rilevare cellule tumorali a livello della prostata e della mammella²⁹. Un'altra regione in cui l'associazione con questa patologia è stata dimostrata è

all'interno del cromosoma 20 e i geni che vengono influenzati in questo caso codificano per proteine aventi un ruolo nella difesa immunitaria polmonare, mediata dai neutrofili, nell'apoptosi e nella fagocitosi.

Esistono anche dei fattori ambientali che hanno dimostrato un peggioramento della patologia quali l'esposizione al fumo, alle sostanze tossiche, ma anche le sovrainfezioni batteriche in particolar modo quella da *Pseudomonas Aeruginosa* che in questi pazienti tende a cronicizzarsi.

I pazienti affetti da Fibrosi Cistica si presentano quindi con un'importante eterogeneità allelica, che viene influenzata non solo dalle mutazioni interne al gene CFTR, ma anche dai *geni modificatori* e dai vari fattori ambientali che ne rendono più o meno severa la prognosi.

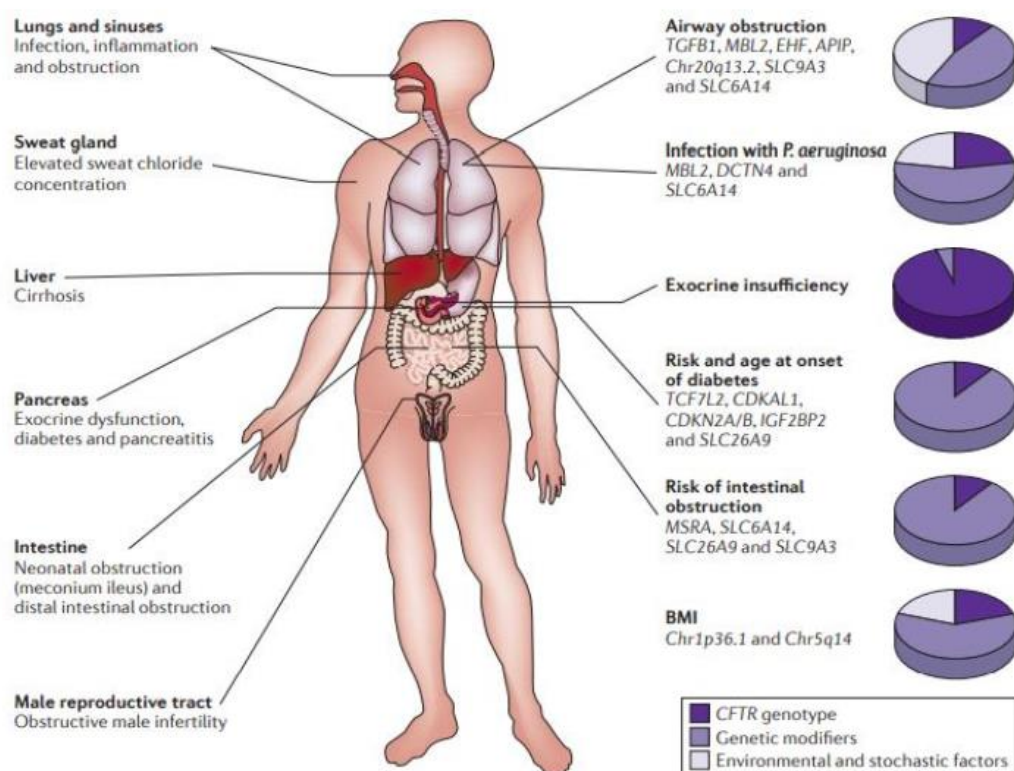


Figura 2 - principali caratteristiche della Fibrosi Cistica e relativi contributi dei geni modificatori, e dei vari fattori stocastici

1.1.4 Patogenesi

Il gene CFTR che si trova sul cromosoma 7 codifica per una proteina transmembrana omonima, con funzione di canale ionico epiteliale. Essa fa parte della famiglia ATP-Binding-Cassette (*ABC*) ed è costituita da due domini transmembrana denominati TMD1 e TMD2, ciascuno formato da sei α -eliche che attraversano più volte la membrana andando a costituire il canale attraverso cui passano i diversi ioni, in primis il cloruro. Sono inoltre presenti due domini aventi la funzione di legare i nucleotidi e di idrolizzare ATP, detti NBD1 e NBD2, ed infine un unico dominio regolatorio RD che presenta dei siti per permettere la fosforilazione delle protein chinasi A e C₃₄. L'apertura del canale transmembrana CFTR è permessa dalla fosforilazione del dominio regolatorio da parte della protein chinasi A (PKA) in seguito all'aumento del cAMP₃₁. La ciclica apertura e chiusura di CFTR è potenziata dall'idrolisi dell'ATP che avviene nei domini leganti i nucleotidi NBDs.

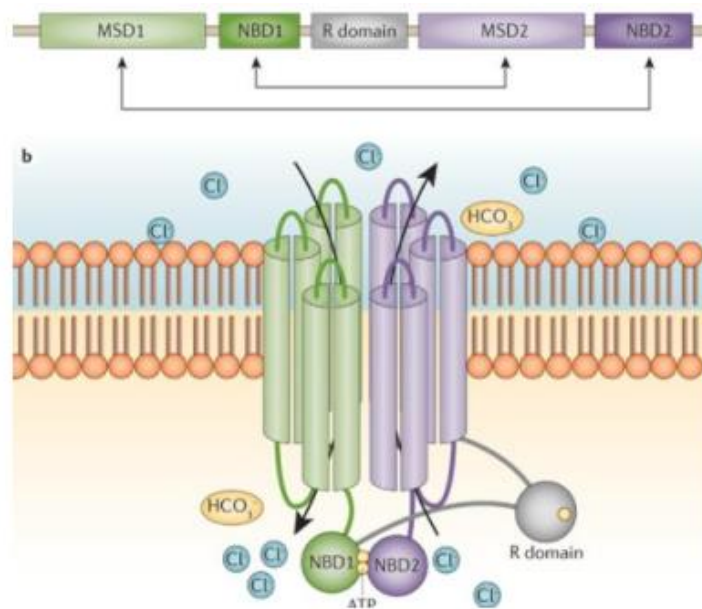


Figura 3 - struttura della proteina canale CFTR35

Il dominio C-terminale, costituito da tre amminoacidi (treonina, arginina e leucina, TRL), è ancorato attraverso interazioni di legame PDZ (ossia domini

presenti in proteine di signaling intracellulare e in altre proteine associate alla membrana plasmatica) a recettori di membrana, a canali ionici e al citoscheletro. Queste caratteristiche di CFTR spiegano perché la mutazione della proteina non influenzi solamente la permeabilità del cloruro, ma anche l'espressione di svariati altri geni che codificano per la risposta infiammatoria, per il processo di maturazione cellulare, il trasporto ionico, e il signaling. Queste proteine sono dei potenziali *gene modifiers*, e quindi possono spiegare le differenti gravità del fenotipo clinico nonostante la mutazione all'interno del gene CFTR sia apparentemente la stessa³¹⁻³⁵.

Il CFTR oltre a permettere il trasporto del cloro, regola anche lo spostamento del bicarbonato attraverso interazioni reciproche con una famiglia di scambiatori denominata SLC6 che sono co-espressi sulla superficie apicale delle cellule epiteliali. Le variazioni dei livelli di bicarbonato in alcune mutazioni del gene risultano particolarmente importanti tanto da alterare il pH dei secreti. Queste modifiche dell'acidità dei secreti a livello luminale creano degli effetti avversi in termini di aumento della precipitazione del muco, il quale va ad occludere i dotti e a favorire il ristagno dei batteri all'interno di questi tappi di mucina. Un organo molto colpito nella Fibrosi Cistica è sicuramente il pancreas, e la causa principale in questo sito è data dall'anomala conduttanza dei bicarbonati che alterano i dotti comportando insufficienza d'organo¹.

Il canale CFTR è espresso principalmente a livello delle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio, digerente, genito-urinario e delle ghiandole salivari e sudoripare, inoltre può localizzarsi anche a livello di alcune cellule non epiteliali, in misura decisamente minore, come in tessuti quali la cornea, il cuore, il sistema nervoso centrale, l'endotelio vascolare, i linfociti, le cellule muscolari lisce dell'aorta, siti nei quali altri geni compensano il deficit funzionale della proteina CFTR³⁶.

Patogenesi a livello delle vie aeree: la malattia polmonare nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica dipende da un'alterata clearance muco-ciliare, ossia il processo che definisce il principale meccanismo di difesa innato verso le infezioni batteriche. L'epitelio delle vie respiratorie normali secerne il cloruro mediante le proteine CFTR, e permette il riassorbimento del sodio attraverso i canali specializzati ENaC che vanno ad estrarre questo ione sul versante baso-laterale della cellula mediante la pompa Na⁺/K⁺ ATPasi. La coordinazione di queste due strutture

genera delle forze elettrochimiche, permette il mantenimento di un sottile strato di liquido sopra alle cellule epiteliali tale da permettere il movimento efficace delle ciglia per la clearance muco-ciliare (*MCC – Mucociliary Clearance*), ma anche una corretta idratazione.

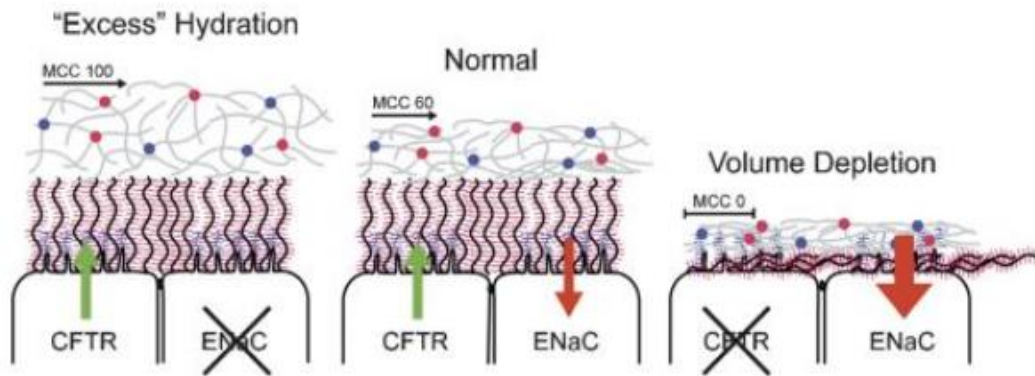


Figura 4 - meccanismo di disidratazione e di deficit della clearance muco-ciliare

Il sistema (*ASL – Airway Surface Liquid*), principalmente alterato nella FC, è costituito da due strati di fluido a contatto con le ciglia:

- La parte superiore è costituita da uno spesso strato di muco denso, formato per l'1% da NaCl, per il 98% da acqua e per l'1% da molecole ad alto peso molecolare. Queste ultime, in particolar modo le mucine, assieme a delle altre proteine epiteliali, vanno a determinare le proprietà viscoelastiche e la sua trasportabilità, dando la caratteristica idratazione della sua superficie. Nel momento in cui lo strato di muco viene correttamente idratato questo permette di intrappolare in modo efficiente i patogeni e le diverse particelle che vengono inalate e che potranno poi essere eliminate mediante il meccanismo ciliare senza l'attivazione della risposta infiammatoria che potrebbe, invece, essere potenzialmente dannosa³⁷;
- La parte inferiore del fluido è costituito invece da uno strato sottile di liquido spesso tra i 7µm e i 30µm, che avvolge le ciglia (*PCL – periciliary liquid*) e che permette un battito efficace grazie alla bassa viscosità, ma che allo stesso tempo, le protegge dallo strato superficiale più denso, prevenendo la formazione di tappi³⁷.

La coordinazione dei canali ENaC (*Epithelial Sodium Channel*) e dei CFTR permette quindi, oltre alla corretta idratazione della superficie, anche

un'adeguata clearance muco-ciliare, meccanismo che risulta appunto alterato nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica. In questa patologia, la perdita della funzionalità di CFTR porterà ad un eccessivo riassorbimento di sodio e di acqua, e ad una scarsa permeabilità del cloruro che di conseguenza ridurranno il volume dello strato superficiale del fluido che va a ricoprire le cellule epiteliali. L'alterato meccanismo osmotico, andando a ridurre l'attività lubrificante dello strato mucoso non permetterà neppure alle ciglia di compiere la loro funzione, bloccandone il movimento e riducendone notevolmente la loro capacità di eliminare i patogeni e le particelle inalate. Il muco denso che si viene a creare a livello delle vie respiratorie andrà a depositarsi formando dei tappi che ostruiranno inizialmente le piccole vie, ed in seguito anche quelle di calibro maggiore, creando una rete di mucine a maglie strette che va a limitare l'accesso dei batteri, ma allo stesso tempo anche dei neutrofili e dei meccanismi di difesa³⁷. L'aumento della secrezione da parte delle mucine, unita all'infiammazione e alle infezioni batteriche che si vanno ad instaurare, creano un loop in cui si ha un'ulteriore riduzione dell'idratazione della sostanza mucopurulenta interluminare che caratterizza infatti le vie aeree dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

L'epitelio respiratorio in un soggetto sano presenta le molecole di ATP a livello del compartimento luminale, e questo susseguirsi è definito dal suo stesso processo costitutivo, ma anche dallo *shear stress*, ossia dallo stress meccanico che si viene a generare nel momento in cui il sangue o l'aria attraversano la superficie cellulare, durante la respirazione. L'ATP interagisce con il recettore luminale P2Y₂ che, a sua volta, va a mediare l'inibizione di ENaC, l'attivazione di CFTR e di CaCC (*Calciumactivated Chloride Channel*), allo stesso tempo questa molecola può venir trasformata da parte di ectoenzimi in ADO, ossia in adenosina, consentendo quindi la sua interazione con i recettori A_{2b} tramite meccanismi dipendenti dall'AMPc, che attiveranno CFTR e indurranno infine, l'inibizione di ENaC. Considerando che nei pazienti affetti da FC la proteina CFTR risulta mancante o alterata, il target dell'adenosina sarà quindi assente e lo stimolo per la produzione del fluido sulla superficie epiteliale sarà prodotto unicamente da parte dell'ATP³⁸.

Il canale ENaC viene quindi regolato negativamente da parte di CFTR e la sua alterazione porta ad una doppia modificazione, riduce gli scambi $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, e diminuisce la secrezione di acqua, e questo porta all'iperattività del canale tale da aumentare il riassorbimento di Na^+ e di H_2O . Questo meccanismo, quindi, è alla base della riduzione dello strato di muco a livello epiteliale e della ridotta clearance muco-ciliare che porta inevitabilmente ad un susseguirsi di infezioni respiratorie³⁹. L'aumentato riassorbimento del sodio dipende anche dall'azione di alcuni enzimi proteolitici che vanno a clivare il canale ENaC in siti differenti; è stato dimostrato come, nei pazienti affetti da FC, venga perso l'equilibrio tra le proteasi che vanno ad attivare i canali, e quelle che li vanno ad inibire, aumentandone di conseguenza la probabilità di apertura dei canali del sodio stesso. La perdita di CFTR contribuisce quindi, al riassorbimento dello ione sia in modo diretto mediante l'interazione tra le proteine, sia in modo indiretto attraverso l'up-regolazione delle proteasi che vanno a creare un microambiente in cui viene favorita l'attivazione dei canali del sodio³⁹.

A livello polmonare i pazienti affetti da FC, considerata la loro ridotta clearance muco-ciliare, sono quindi fortemente predisposti a contrarre un gran numero di infezioni sia virali che batteriche croniche. In un primo periodo i soggetti sono affetti da bronchiti croniche che, con l'intensificarsi del processo infiammatorio, e con le eventuali sovrainfezioni che si verificano, generano bronchiectasie ed un quadro finale di insufficienza respiratoria. A livello polmonare i neutrofili vengono intensamente richiamati in caso di infezioni di tipo micotico o batterico, e proprio in questo sito vanno ad attivarsi rilasciando radicali dell'ossigeno, proteasi ed elastasi, ma anche sostanze ossidanti e prodotti della reazione infiammatoria, che hanno il fine ultimo di provare ad eliminare l'infezione. Questa condizione persistente che si viene a creare a livello polmonare provoca un'ipersecrezione da parte delle mucine che va a rendere ancora più viscoso e ricco lo strato di fluido che riveste le vie aeree, e che porterà in ultima analisi all'ostruzione del flusso prima nei piccoli rami, e poi in quelli di calibro maggiore attraverso un meccanismo che reiteratamente si viene a presentare. I soggetti affetti da Fibrosi Cistica, oltre ad essere predisposti alle infezioni batteriche e micotiche, lo sono anche per quelle virali, come ad esempio per il Virus

Respiratorio Sinciziale (*RSV*) che portano ad una aumentata produzione dell'ectoenzima di superficie che metabolizza l'ATP e che va a ridurre il fluido che ricopre la superficie dell'epitelio respiratorio⁴⁰.

Nel tessuto polmonare sono presenti anche delle anti-proteasi, che hanno la funzione di ridurre e bilanciare l'effetto dannoso causato dalle proteasi prodotte dai neutrofili, ma che, considerata la rilevante up-regolazione delle proteasi stesse³⁹ nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica, non riescono a compensare in modo sufficiente questo meccanismo. Gli enzimi, che catalizzano il taglio delle proteine maggiormente coinvolti in questo processo, sono le serin-proteasi, la calgranulina, e le metalloproteasi della matrice, che provocano il danno degradando le componenti tissutali, come l'elastina, e attivando i recettori TLR (*Toll-Like Receptor*) del complemento, del sistema immunitario⁴¹.

I polmoni vengono colpiti a livelli differenti durante l'evoluzione della patologia e, all'inizio, si ha a livello dei lobi superiori in quanto meno perfusi rispetto ai lobi inferiori a causa dell'effetto gravitazionale, e che vengono quindi colpiti in un secondo momento. A causa della riduzione dello *shear stress* del flusso dell'aria, la mucosa potrà produrre una minor quantità di ATP, e di conseguenza un muco più denso e viscoso causato dall'inibizione del riassorbimento di sodio e dalla stimolazione ad una aumentata secrezione di cloro attraverso P2Y²⁴².

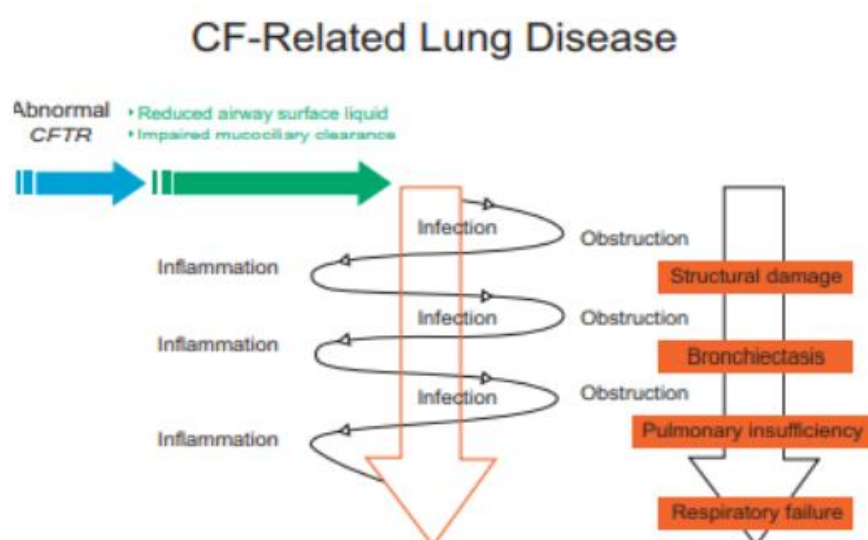


Figura 5 - meccanismo patogenetico di alterazione strutturale e di danneggiamento a livello delle vie aeree⁴²

Patogenesi a livello epato-pancreatico: il processo che interessa i dotti pancreatici è molto simile a quello che si presenta a livello dell'epitelio delle vie respiratorie in quanto si viene a formare, anche in questo sito, un muco denso occludente i dotti. Gli studi suggeriscono un importante ruolo riferito alle proteine CFTR nello sviluppo delle pancreatiti, in particolar modo per quanto riguarda il pH intraluminale e la secrezione di bicarbonato, ma anche l'infiammazione che coinvolge le proteine intraduttali. Durante il rilascio dei vari enzimi a livello digestivo, in un soggetto sano, si ha anche quello dei protoni $[H^+]$, ma nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica con la riduzione del rilascio del bicarbonato, si ha anche una ridotta alcalinizzazione del lume acinare che promuove invece lo sviluppo delle pancreatiti a partire dall'acidificazione del lume che fa perdere l'integrità delle *tight junction* e che permette in conclusione il passaggio degli enzimi digestivi nello spazio interstiziale⁴³.

A livello dei canalicoli epatici il danno, secondo gli studi condotti, è principalmente determinato dall'infiammazione che viene causata dall'alterazione della composizione della bile e dal conseguente stimolo che viene indotto a favore di un rilevante deposito di fibre di collagene. Le proteine CFTR hanno un ruolo rilevante per quanto concerne il riassorbimento dell'acqua a livello dei colangiociti epatici e della colecisti, quindi nei pazienti affetti da FC si avrà un'alterazione della composizione chimica che porterà all'ipertensione portale, ma anche alla cirrosi soprattutto per i pazienti che presentano mutazioni facenti parte delle classi I-II-III⁴⁴.

Patogenesi a livello dei dotti deferenti: i pazienti affetti da FC sono spesso caratterizzati dall'assenza di vasi deferenti associati ad anomalie dell'epididimo, delle vescicole seminali, e dei dotti eiaculatori. La mutazione CFTR producendo una disidratazione delle secrezioni proteiche provoca infatti un'occlusione del lume del vaso. La conferma della diagnosi può essere condotta mediante un'esplorazione chirurgica, che viene eseguita però molto raramente, oppure mediante lo studio del liquido seminale (azoospermico), del volume, del pH e dei livelli di fruttosio che risultano, nei pazienti affetti da FC, alterati in modo rilevante⁴⁵.

Patogenesi a livello delle ghiandole sudoripare: l'alterazione del CFTR caratterizza anche questo epitelio perciò viene a mancare il processo di riassorbimento dei sali nel sudore isotonic primario e ciò rende le concentrazioni di sodio e di cloro molto rilevanti. Per questo motivo i pazienti in occasione di gastroenteriti, o durante il periodo estivo, sono soggetti a meccanismi di deplezione di sali con alcalosi ipocloremica. Il processo che si manifesta a livello delle ghiandole sudoripare viene utilizzato per la diagnosi e il follow up nella FC proprio per le sue caratteristiche⁴⁶.

1.1.5 Screening neonatale del portatore

Lo screening per la Fibrosi Cistica è principalmente costituito da due modelli: lo screening neonatale (*NBS – Newborn Screening*) e lo screening del portatore (*carrier screening*). Lo screening neonatale, NBS, viene attuato in aree in cui la FC risulta essere maggiormente ricorrente come ad esempio nel Nord America, in Australia, e in molti paesi europei, tra cui l'Italia. I bambini vengono sottoposti ad un primo esame per identificare potenziali portatori di questa patologia, e una volta fatta la diagnosi, potranno ricevere dei trattamenti il più precocemente possibile¹¹. I metodi che vengono utilizzati nei neonati sono essenzialmente tre: il test del pepsinogeno immunoreattivo (*IRT*) combinato con l'analisi del DNA, il test del tripsinogeno immunoreattivo ripetuto (*double IRT testing*) e il test della proteina associata alla pancreatite (*PAP*). La scelta che predilige una metodica a discapito di un'altra è definita unicamente da aspetti geografici, economici, ed anche etnici².

L'IRT test consiste nel misurare il tripsinogeno immunoreattivo su un piccolo campione di sangue che viene prelevato dal neonato a livello del tallone dopo poche ore dalla nascita, in seguito ad un eventuale riscontro di ipertripsinogemia, segue un secondo test che può essere l'analisi di CFTR per riscontrare possibili mutazioni, oppure la ripetizione dell'IRT test stesso. Entrambe queste metodiche di screening permettono di determinare i malati con una sensibilità stimata attorno al 90-95%¹⁰.

L'NBS permette allora di identificare i neonati con maggior rischio di essere affetti da FC, ma questo esame non può essere ritenuto diagnostico in quanto

l'accertamento di malattia si ha solo nel momento in cui verrà effettuato il test del sudore.

Lo screening si è rivelato un esame comunque essenziale in quanto permette di ridurre la severità della malattia, i costi delle cure, e soprattutto di migliorare la prognosi dei pazienti che possono accedere, in questo modo, più rapidamente alle adeguate terapie. La diagnosi neonatale permette inoltre di controllare e di limitare alcune comorbidità che comporta la Fibrosi Cistica, come ad esempio le deficienze nutrizionali precoci, di migliorare la crescita ponderale e posturale nel lungo termine, e le funzioni cognitive⁶.

Lo screening del portatore è un esame che viene meno utilizzato rispetto al NBS, ma che è comunque offerto alle coppie, o alle donne, in un periodo preconcezionale in paesi in cui è maggiormente ricorrente questa patologia¹¹. Attualmente viene associato ad una consulenza genetica che ha la funzione di permettere di prendere una decisione il più soppesata e cosciente possibile, ai familiari di una persona affetta da FC, oppure ai genitori di un altro figlio identificato come eterozigote (NBS positivo, test del sudore negativo associato o meno ad una sola mutazione a livello di CFTR). Lo scopo che si propone questa tipologia di screening è quello di individuare soggetti adulti eterozigoti, per permettere loro di compiere scelte riproduttive informate prima del concepimento e della nascita di un figlio affetto da FC. Le coppie che vengono identificate come eterozigoti, dato che questa patologia ha una trasmissione di tipo autosomico recessivo, hanno una probabilità del 25% di avere un figlio affetto, e possono quindi scegliere diverse alternative riproduttive se identificati prima del concepimento, oppure più limitate quando la gravidanza è già instaurata⁴⁷.

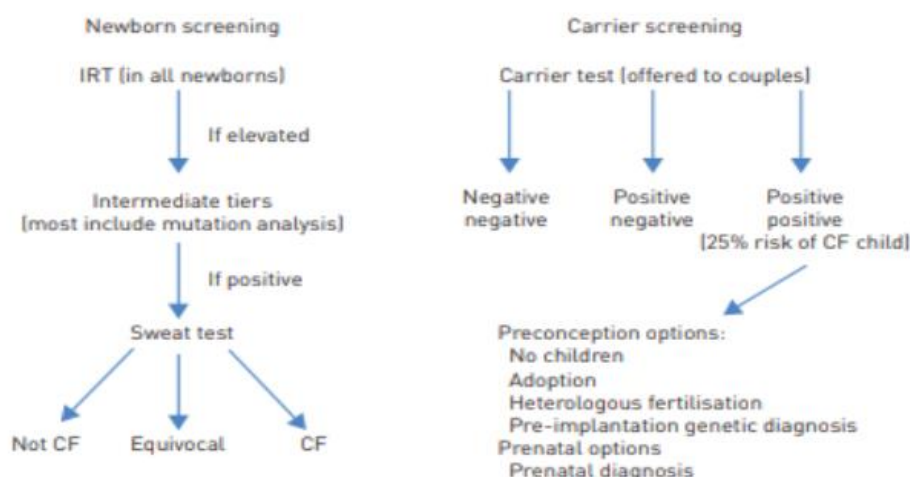


Figura 6 - algoritmo diagnostico per lo screening del neonatale e del portatore per FC⁴⁷

È stato condotto uno studio da parte del Dott. Castellani nel nord-est d'Italia che ha permesso di evidenziare come, l'accesso alle adeguate ed esaustive notizie permesse dallo screening del portatore a basso costo, e l'accesso a questo per un numero maggiore di adulti, comportava una minor nascita di neonati affetti da Fibrosi Cistica⁴⁸. In linea teorica lo screening al portatore potrebbe essere proposto quindi a tutte le coppie in età riproduttiva per permettere loro di effettuare un'eventuale cosciente scelta, sostituendo di fatto lo screening neonatale. Questa ipotesi trova però una risonanza limitata in quanto, il NBS può raggiungere tutti i neonati mentre, dovendo essere condotto in epoca pre-concezionale, lo screening al portatore ha sicuramente una complessità logistica maggiore. Quest'ultimo, inoltre, ricercando le mutazioni genetiche che si presentano con una frequenza superiore allo 0.5% nella popolazione locale, ha una sensibilità dell'85% a differenza dello screening neonatale in cui viene anche superato il 95%.

1.1.6 Diagnosi

Per diagnosticare la Fibrosi Cistica sono necessari dei criteri, quali:

- Presentare sintomi clinici compatibili con la patologia in almeno un organo, oppure essere risultati positivi al test neonatale o avere fratelli o sorelle con diagnosi di FC;
- Evidenziare una disfunzione del canale transmembrana CFTR attraverso il test del sudore oppure avere una differenza di potenziale nasale positiva, o avere una mutazione biallelica del gene⁶.

La maggior parte dei pazienti, ossia il 66%, vengono diagnosticati in età neonatale o comunque prima del compimento dei due anni di vita, ma una percentuale rilevante, il 12% del totale degli affetti, viene individuata dopo i 18 anni avendo questi delle caratteristiche fenotipiche inizialmente più miti.

Test del sudore: questo esame prevede la somministrazione transdermica di pilocarpina, che viene fatta assorbire per mezzo della ionoforesi dalla cute con lo scopo di stimolare la secrezione da parte delle ghiandole sudoripare.

In seguito, il sudore, che per essere considerato sufficiente deve avere un volume minimo di 75 mg, ottenuto con il *metodo Gibson-Cooke*, o di 15 µL, se con *metodo Macroduct coil collection*¹⁰, viene raccolto su una garza o su carta da filtro e pesato, mentre viene analizzata e titolata la sua concentrazione di cloruro. Il test, che viene utilizzato da oltre 50 anni, è ancora considerato il più sensibile e specifico per la diagnosi di Fibrosi Cistica (il suo valore viene ritenuto patologico se si presenta superiore o uguale a 60mmol/L di cloruro nel sudore)¹⁰. È stato dettato un protocollo, da parte della *Cystic Fibrosis Foundation (CFF)*, che elenca delle linee guida che hanno lo scopo di poter raccogliere un campione di sudore il più adeguato possibile. Se i neonati risultano positivi al test neonatale NBS ma sono asintomatici, questi dovranno pesare almeno 2 kg e dovranno aver raggiunto la 36^a settimana di gestazione per poter eseguire il test del sudore. Inoltre, questo esame dovrebbe essere eseguito bilateralmente, e il sudore analizzato separatamente, il prima possibile dopo il decimo giorno, momento in cui

solitamente si rendono disponibili i risultati del NBS, e idealmente entro il primo mese di vita. Questo test deve essere effettuato tempestivamente per ridurre il rischio di malnutrizione grave e di altre problematiche come la disidratazione iponatriemica potenzialmente fatale⁶. Nonostante questo protocollo il test del sudore può risultare inconclusivo per mesi o anche per anni in alcuni pazienti. Nel caso i neonati risultassero negativi a questo esame, ma positivi al test neonatale, in presenza di sintomi clinici di malattia o di storia familiare di pazienti affetti da FC, si rende necessario ripetere il test del sudore.

Le nuove linee guida, rispetto a quelle del 2008, hanno stabilito che non è necessario un secondo esame nel momento in cui il test del sudore risulta positivo. Il valore del cloro nel sudore viene considerato patologico quando superiore a 60 mmol/L, mentre di tipo intermedio, ossia suggestivo ma non diagnostico, per valori compresi tra 40 mmol/L e 60 mmol/L, mentre il cut-off di normalità al test del sudore è di 40 mmol/L, a differenza di un neonato con meno di sei mesi in cui è stato stabilito a 30 mmol/L. Nel momento in cui il soggetto delineasse dei risultati al test incerti, per avere una diagnosi, si dovrebbe fare un'analisi genetica di CFTR e, se si presentassero due mutazioni causanti la malattia si potrebbe confermare la diagnosi, mentre se gli alleli fossero wild-type la FC sarebbe considerata fortemente improbabile⁶.

Le manifestazioni cliniche che richiedono l'esecuzione del test del sudore si presentano a livello dell'apparato respiratorio sottoforma di tosse, polmoniti, bronchiolite, emottisi, atelettasie, ma anche di sinusiti ricorrenti o di polipi nasali; nell'apparato gastrointestinale i segni comprendono l'ileo da meconio, il malassorbimento, l'ipovitaminosi di A, D, E, K, la cirrosi epatica, l'ittero colestatico infantile, l'ittero neonatale protratto o la pancreatite.

I pazienti affetti da FC, inoltre, possono presentare un ritardo della crescita, azoospermia o assenza dei dotti deferenti. Nel momento in cui si presentassero quindi queste manifestazioni e il genotipo apparisse di tipo indefinito, allora potrebbe essere opportuno testare la funzionalità di CFTR a livello dell'epitelio nasale oppure a livello della mucosa rettale mediante gli opportuni test⁶.

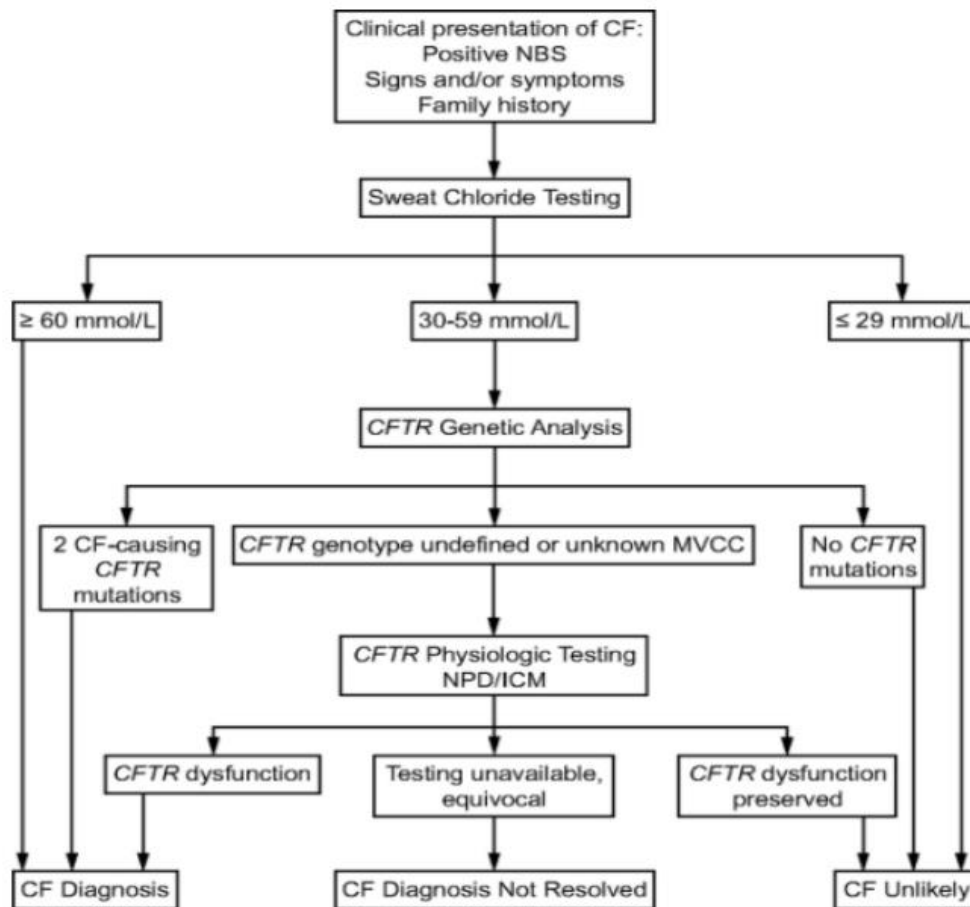


Figura 7 – algoritmo diagnostico per la FC₅₃

Il *Gold Standard* per la diagnosi di Fibrosi Cistica è costituito comunque dal test del sudore supportato da altre evidenze di tipo clinico-fenotipico.

Analisi genetica: questo esame viene condotto in laboratori genetici specializzati, e consiste nell'identificazione delle mutazioni associate alla FC, che risulta essenziale per il percorso terapeutico che può essere proposto ai pazienti. I pannelli che vengono proposti per lo screening identificano più del 90% delle mutazioni della popolazione caucasica, ma considerando che le varianti di CFTR individuate sono più di 2000, e che queste si presentano in modo differente anche in base all'etnia, è evidente come non tutte vengano identificate. Quelle non riconosciute saranno il 6%, e meno del 10% degli affetti in Italia risulterà avere almeno un allele non identificato^{14,15}. Nel caso invece si prenda in considerazione una popolazione non caucasica, in cui gli alleli hanno una prevalenza differente, il

pannello che viene preso in considerazione rileva una quota di mutazioni causanti la FC decisamente minore¹¹.

NPD, Nasal Potential Difference: questo esame può essere utilizzato per i soggetti in cui lo screening neonatale risulta positivo, il test del sudore intermedio e in cui non vengono identificate entrambe le mutazioni di CFTR, ma persiste un forte sospetto dato dal fenotipo e dalle manifestazioni cliniche che questo presenta. In tale situazione si può quindi prendere in considerazione la misurazione della differenza di potenziale nasale. L'analisi viene eseguita a livello del turbinato nasale inferiore in cui si presenta un epitelio ciliato pseudocolonnare che ha delle caratteristiche simili a quelle dell'epitelio delle vie aeree inferiori, ma che, essendo facilmente raggiungibile, permette uno studio del trasposto ionico più semplice.

In seguito alla stimolazione della protein chinasi A (*PKA*), causata dalla somministrazione di amiloride, che ha la funzione di inibire i canali ENaC, viene quindi misurata la tensione. Il test viene considerato positivo nel momento in cui si osserva un aumento della differenza di potenziale elettrico transepiteliale nasale, a cui segue l'assenza di risposta all'isoprotenerolo, un β -agonista adrenergico. Questo esame in un soggetto sano presenta valori di -20 mV, mentre in uno affetto da FC i valori saranno di circa -40 mV^{49,50}.

Test ancillari per accertare la diagnosi o stabilire il grado di severità: in alcuni soggetti il test del sudore risulta avere valori intermedi anche una volta ripetuto, mentre l'analisi genetica non individua entrambi i siti alterati di CFTR ma solamente uno unico o nessuno, in questo caso, se continua a persistere il sospetto di diagnosi di Fibrosi Cistica, oltre a poter fare il NPD, è possibile anche effettuare delle analisi del DNA più approfondite, ricercando, in questo caso, un'eventuale malattia correlata a CFTR, *CFTR-RD*.

Nel momento in cui anche queste eventuali analisi non dovessero portare all'esito auspicato, ma persistesse il sospetto è opportuno monitorare strettamente questi soggetti in attesa della comparsa di eventuali sintomi che possano diagnosticare la patologia. I siti che devono essere controllati in attesa di possibili manifestazioni sono:

- *Pancreas, funzione esocrina*: l'attività di questo organo può essere valutata in modo indiretto oppure diretto. In un primo caso si può infatti andare a dosare l'elastasi fecale 1 (*EF-1*), enzima proteolitico sintetizzato dalle cellule acinose del pancreas che dovrebbe risultare superiore a 200 µg/g in un soggetto sano, ma che, se rilevato di un valore inferiore potrebbe supportare la diagnosi di FC. Valori normali di EF-1, tuttavia, non possono escludere il sospetto di malattia in quanto molti pazienti potrebbero non presentare manifestazioni a livello di questo organo mostrando, ad esempio, alterazioni più *mild*. La funzione pancreatica può anche venir studiata in modo diretto, ossia mediante la raccolta del fluido duodenale che segue la stimolazione fatta mediante la secretina e la colecistochinina, anche in questo frangente, se venisse rilevata una riduzione dei valori la diagnosi potrebbe essere supportata, viceversa non potrebbe essere comunque esclusa. Questa metodica viene proposta di rado in quanto lunga, complessa, costosa e fastidiosa per il paziente. Infine, può essere monitorata anche l'eventuale comparsa di pancreatite cronica ricorrente che si è osservato associarsi di frequente ad un disturbo CFTR-correlato^{51,52}.
- *Seni paranasali*: vengono valutati mediante TC, e nel momento in cui viene rilevata una pansinusite cronica allora la diagnosi di disturbo CFTR-correlato può essere maggiormente supportata.
- *Fertilità*: l'azoospermia è strettamente correlata alla diagnosi di Fibrosi Cistica nei maschi adulti e maturi, quindi lo studio del liquido seminale può avvalorare il sospetto⁴⁵.
- *Funzionalità polmonare*: viene condotta una valutazione dettagliata che include test quali la spirometria, esami colturali per la rilevazione di patogeni delle vie respiratorie associati a FC, e il broncolavaggio alveolare (*BAL*) per l'esame citologico e per le colture microbiologiche. Sono inoltre

necessari dei test per escludere la discinesia ciliare e un'eventuale immunodeficienza, questi, molto spesso però, non sono praticabili per la valutazione della patologia nei neonati. Infine, nel momento in cui venissero riscontrate delle bronchiectasie durante questi esami, queste supporterebbero il sospetto di FC⁵³.

La funzionalità polmonare viene solitamente misurata e monitorata nel tempo attraverso la spirometria, ma un altro metodo considerato attendibile e molto utile è l'*LCI*, *Lung Clearance Index*, un indice che permette di misurare il grado di disomogeneità ventilatoria. Questo esame permette di identificare in maniera più accurata rispetto alla spirometria, il deficit polmonare che possono avere dei pazienti che si presentano con FEV₁ invece normale. Questa tecnica è considerata un'alternativa all'*HRCT* (*High Resolution Computed Tomography*), già molto sensibile, permettendo di mettere in evidenza le anomalie polmonari precoci che possono presentarsi nei pazienti affetti da FC, inoltre può essere utilizzata per osservare anche i miglioramenti apportati dalle terapie soprattutto nei bambini con lieve malattia polmonare andando ad indagare i piccoli rami polmonari dello spessore anche inferiore ai 2 mm⁵⁴.

1.1.7 Manifestazioni cliniche

La Fibrosi Cistica è una patologia che si manifesta in modo molto eterogeneo grazie alle più di 2000 diverse mutazioni che intervengono nel gene CFTR, ma anche alle differenti localizzazioni cromosomiche che codificano geni specifici contribuenti alla variabilità del fenotipo. I sintomi e i segni sono estremamente vari e possono presentarsi già alla nascita, oppure talvolta nell'età adulta.

Apparato respiratorio: la compromissione respiratoria è sicuramente una delle manifestazioni più frequenti e caratterizzanti la Fibrosi Cistica. La clinica può essere molto varia ma la tosse sembra essere il più costante sintomo di coinvolgimento di questo apparato. Solitamente è di tipo produttivo e l'espettorato si presenta purulento, abituale, con acuzie al mattino o durante l'esercizio e lo sforzo fisico. Alcuni pazienti possono rimanere per un lungo periodo asintomatici

o possono presentare degli episodi intensi di acuzie caratterizzati da importanti infezioni, mentre altri soggetti possono sviluppare una forma cronica di tosse o di polmonite sin dalle prime settimane di vita. I neonati possono manifestare, inoltre, un altro sintomo caratteristico durante il primo anno di vita, detto *wheezing* o respiro sibilante, un fischio di tonalità anche abbastanza elevata prodotto dal flusso dell'aria che passa attraverso le strette vie aeree, e che sottende la presenza di estese bronchioliti, che preoccupa notevolmente i genitori¹¹.

Le secrezioni prodotte sono molto difficili da eliminare in quanto normalmente l'espettorato contiene una flora batterica molto complessa che comprende ad esempio, lo *Staphylococcus Aureus*, l'*Haemophilus Influenzae* e lo *Pseudomonas Aeruginosa*⁵⁹.

Il decorso della pneumopatia presenta delle fasi subacute, e delle altre di acuzie molto importanti che richiedono spesso volte dei periodi di ospedalizzazione per la somministrazione di intense terapie endovenose.

La sintomatologia che può presentarsi in corso di esacerbazione comprende:

- L'aumento della produttività dell'espettorazione;
- L'aumento della frequenza, dell'intensità e della durata della tosse;
- L'aumento della purulenza dell'espettorato;
- La comparsa di emottisi o di striature ematiche nell'espettorato;
- La congestione toracica e/o dispnea;
- Il dolore toracico;
- La ridotta tolleranza allo sforzo;
- Il senso di malessere, astenia, mialgie;
- La perdita di appetito⁶⁰.

I segni fisici che possono invece presentarsi sono:

- La comparsa o aumento del distress respiratorio, che si manifesta con l'aumento della frequenza respiratoria e la comparsa di rientri giugulari e intercostali;
- La comparsa o accentuazione dei rumori umidi e secchi apprezzati durante l'auscultazione;

-
- La febbre;
 - La ridotta tolleranza agli sforzi fisici e all'attività sportiva;
 - La perdita del 5% del peso corporeo negli ultimi 6 mesi⁶⁰.

Gli esami strumentali, infine, possono evidenziare:

- Una riduzione della FEV₁ di un valore superiore al 10% rispetto al valore migliore registrato negli ultimi 4-6 mesi;
- La comparsa di infiltrati, atelettasia, o aumento dei rilievi polmonari alla radiografia toracica;
- Una riduzione della saturazione dell'ossigeno (SpO₂) di più del 5% negli ultimi mesi o inferiore al 90%;
- La leucocitosi neutrofila⁶⁰.

La diagnosi di un'eventuale esacerbazione polmonare si basa sulle alterazioni recenti dello stato di salute del paziente rispetto alla sua condizione basale; infatti, pur avendo valori di FEV₁ all'interno del range di normalità, se aumenta la tosse, o se si presenta un aumento dell'espettorazione, o una riduzione dell'appetito associato ad astenia o mialgie, è possibile diagnosticare la riacutizzazione della patologia⁵⁹.

Il quadro clinico peggiorato dei pazienti spesso trova ragione nelle infezioni virali o nell'acquisizione di nuovi batteri. La maggior parte delle volte si ha un'espansione clonale di un patogeno già cronicamente presente che scatena l'infiammazione con l'attivazione intensa di fattori come IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF α , ma anche dei neutrofili a livello polmonare ⁶¹.

I patogeni che vengono maggiormente rilevati nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica includono Gram positivi come, *Staphylococcus Aureus*, *Burkholderia Cepacea Complex*, bastoncelli Gram negativi quali, *Stenotrophomonas Maltophilia*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Achromobacter Xyloxydans*, funghi e micobatteri non tubercolari. L'infezione in un primo momento sembra essere di tipo intermittente, mentre in seguito le vie aeree vengono infettate in modo cronico e l'eradicazione risulta essere praticamente impossibile. Particolare

attenzione deve essere posta ai soggetti colonizzati dall'*Aspergillus Fumigatus*, presente nel 5% dei pazienti, in quanto questo può essere responsabile dell'Aspergillosi Broncopolmonare Allergica (ABPA), patologia caratterizzata da una reazione infiammatoria IgE-mediata e da una sua manifestazione a livello di focolai broncopneumonici peri-ilari, con sintomi asmatici. Il muco che ostruisce le vie aeree dei pazienti affetti da FC permette, infatti, la germinazione delle spore e in seguito il rilascio di antigeni che scateneranno la reazione immunitaria con i danni che ne conseguono nell'ospite. Un altro patogeno spesso presente in questi soggetti, è lo *Pseudomonas Aeruginosa*, che viene trovato sia a livello polmonare, che nelle vie aeree superiori, e si è visto essere propenso ad evolvere in un fenotipo “mucoide” che lo rende poco permeabile ad agenti antimicrobici, e più pronò alla colonizzazione^{59, 60, 61}.

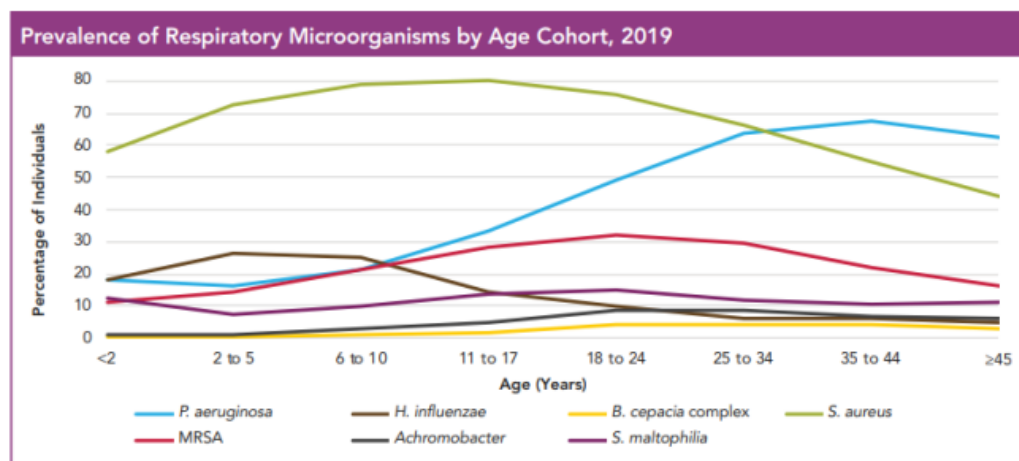


Figura 8 – prevalenza di microorganismi in base alla fascia di età¹⁰⁹

I reperti obiettivi precoci che vengono individuati solitamente includono l'aumento del diametro antero-posteriore del torace (definito quindi, a botte), crepitii diffusi, iperfonesi plessica e clubbing digitale; in seguito, già nella prima decade, si iniziano a presentare le complicanze come atelettasie, pneumotorace, emottisi e cuore polmonare. Un altro segno comune che si può venire ad osservare è l'ostruzione nasale associata anche a rinorrea, con ogni probabilità causate dall'attivazione del sistema infiammatorio a livello della mucosa nasale. Infine, la poliposi nasale che si manifesta frequentemente nei pazienti giovani in modo paucisintomatico, può in alcuni soggetti ridurre notevolmente la qualità di vita, in particolar modo tra i 5 e i 20 anni, causando a sua volta anche frequenti

esacerbazioni polmonari data la colonizzazione dei seni paranasali. In questo distretto il patogeno maggiormente riconosciuto è lo *Pseudomonas Aeruginosa* che ha un grande impatto anche in seguito al trapianto polmonare e che condiziona in modo rilevante la mortalità e la morbilità dei pazienti⁶².

I pazienti affetti da FC, si sottopongono in modo costante al monitoraggio della loro situazione clinica, ed in particolare utilizzano anche la spirometria per valutare le vie aeree. Si considera normale una riduzione, in questi soggetti, dell'1-2% del valore della FEV₁%/anno rispetto al suo valore standard per età, sesso e statura; nel momento in cui il soggetto ha un peggioramento del volume espiratorio forzato al primo secondo invece, è necessaria un'attenta valutazione in quanto, in questa situazione, si può presupporre esserci un nuovo episodio di esacerbazione, una scorretta gestione della terapia, o una non sufficiente incisività di questa. Le complicanze che possono seguire la pneumopatia possono essere delle striature ematiche nell'espettorato, ma anche l'emottisi, originate dal danno delle arteriole bronchiali che, a causa dell'alterazione di CFTR, sono più superficiali e varicose rispetto a quelle di un soggetto sano. Inoltre si può osservare l'evolversi di uno pneumotorace, causato dalla rottura delle bolle aeree subpleuriche formate dal danno progressivo indotto in particolar modo nei lobi polmonari superiori. L'insufficienza respiratoria che si instaura nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica, è data dall'alterazione dell'equilibrio ventilo-perfusorio, e viene accentuata inizialmente durante l'esercizio fisico e lo sforzo, in seguito nel sonno e nelle fasi acute della malattia, per poi instaurarsi in modo cronico, persistente e costante. In quest'ultima fase, a causa anche della sempre più accentuata broncocostrizione si ha un'aumentata ipoventilazione alveolare responsabile dell'ipercapnia. Il monitoraggio della rapidità con cui si instaura il susseguirsi delle complicanze polmonari viene sfruttato anche per definire il miglior timing per la valutazione del trapianto polmonare a cui spesso volte i pazienti affetti da FC vanno incontro⁵⁵⁻⁶¹.

Apparato gastro-intestinale: l'espressione di CFTR si ha a livello di tutto il tratto gastrointestinale e pancreatico, e la perdita di funzione del canale comporta delle conseguenze sin dal periodo fetale.

- *MI, Ileo da meconio:* è la completa ostruzione dell'ileo terminale che si presenta approssimativamente nel 20% dei neonati affetti da FC. Si

manifesta come una distensione delle anse intestinali a monte del tratto in quanto il ridotto contenuto di acqua provocato dall'alterazione del canale CFTR, associato all'attività proteolitica e all'aumento dell'albumina provocano una distensione visualizzabile anche ecograficamente nel periodo prenatale. È stato dimostrato che l'80-90% dei neonati che presentano ileo da meconio sono affetti da FC e clinicamente si presentano con una distensione addominale accompagnata da emesi e da alvo chiuso che raramente possono complicarsi evolvendo in peritonite da meconio, dovuta alla rottura intrauterina della parete intestinale⁶⁶. L'MI può presentarsi in forma semplice o complicata, da volvolo, necrosi, atresia gastrointestinale e perforazione, quest'ultima più probabile in questo tipo di pazienti. Molto spesso l'evoluzione rapida di questa manifestazione richiede un approccio mediato da un intervento chirurgico di tipo resettivo che viene adottato già nelle prime settimane di vita⁶³⁻⁶⁶.

- *DIOS, Distal interstitial obstruction syndrome*: l'occlusione intestinale può presentarsi non solo in età neonatale, ma anche adolescenziale e adulta. Questo disturbo, presente nel 10-25% dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica, si manifesta con quadri subocclusivi o occlusivi, crampi, coliche e forte dolore addominale, dati da un rallentamento del transito intestinale e dalla formazione di fecalomi a livello dell'ileo distale. I soggetti che ne soffrono hanno solitamente un genotipo CFTR associato a un fenotipo severo ⁶⁷.
- *Alterata digestione di proteine e grassi*: è un aspetto sicuramente molto rilevante dato che interessa l'85% dei pazienti pediatrici comportando sin dai primi anni di vita un importante rallentamento della crescita. La variabile perdita calorica, nonostante venga trattata con una supplementazione di enzimi pancreatici, si presenta con inappetenza specie durante le fasi di acuzie come le comuni infezioni del tratto respiratorio, aumentato consumo energetico o febbre. Si verificano anche deficit vitaminici, in particolare di tipo liposolubile, ovvero A, D, E, K, che possono manifestarsi con cecità notturna, osteomalacia, areflessia, anemia emolitica e diatesi emorragica. I sintomi che si possono osservare a causa della maldigestione di proteine e grassi, la cui genesi con ogni probabilità è di tipo multifattoriale, sono: feci abbondanti e frequenti

contenenti grassi, incapacità di aumentare il peso corporeo nonostante una controllata e adeguata alimentazione, meteorismo intestinale e rallentamento della crescita. In casi gravi si può osservare anche anasarca associato a iponatriemia e disfunzioni neurologiche, tra cui demenza e neuropatia periferica^{11,69}.

- *Esofagite*: il reflusso gastrico, molto comune nei pazienti pediatrici durante i primi mesi di vita, associato a tosse può evolvere in esofagite.
- *Gastrite e antrite*: parallelamente all'esofagite indotta dal reflusso gastrico, il reflusso gastroduodenale può indurre queste condizioni.
- *Prolasso rettale*: la reale incidenza di questa manifestazione non è stata ben definita, ma si è visto presentarsi maggiormente nei bambini in età inferiore ai 5 anni e ridursi in corrispondenza della supplementazione degli enzimi pancreatici che prevengono le principali cause, ossia la costipazione e la stipsi⁶⁹.

Fegato e vie biliari: di frequente la Fibrosi Cistica ha un interessamento epatico, ma spesso volte questo è riscontrabile solo mediante imaging ecografico, oppure osservando l'aumento degli enzimi epatici sierici, mentre di rado si ha l'evidenza dell'espressione di cirrosi biliare, inoltre è possibile anche osservare una rilevante ipertensione portale. Data l'alterazione di CFTR, i duttuli biliari sono ostruiti da materiale mucoso a cui si associano infiammazione portale e proliferazione duttulare. L'ostacolo al deflusso provoca una stasi biliare e una reazione infiammatoria focale che evolve, quindi, in fibrosi periportale. La steatosi epatica, osservabile mediante biopsie, infine, nel 10% dei pazienti circa, diventa cirrosi biliare focale che interessa l'intero fegato in modo grave, e che si manifesta sottoforma di noduli diffusi. La cirrosi biliare appare sintomatica nel 5-7% dei pazienti evidenziando ittero, ascite, ematemesi da varici e ipersplenismo. Seppur l'interessamento epatico sia il più delle volte paucisintomatico dopo la prima decade, il 12% dei pazienti affetti da FC, presenta episodi di coliche biliari secondarie a colelitiasi causata probabilmente dall'eccessiva perdita di acidi biliari nelle feci che sfocia in "bile litogenica" con accumulo di materiale mucoide nella colecisti. Quest'ultimo organo viene spesso osservato, infine, atrofico, come microcolecisti^{3,11,71}.

Pancreas: può manifestarsi con differenti tipi di patologie

- *Insufficienza pancreatica esocrina:* nei 2/3 dei pazienti si evidenzia sin dai primi mesi di vita, ed interessa l'85% degli affetti da FC, ad un anno dalla nascita. I dotti venendo ostruiti dal viscoso e denso muco portano all'atrofia degli acini che quindi si dilatano e vanno a formare delle microcisti, associandosi alla fibrosi parenchimale e alla sostituzione adiposa con un deterioramento finale della funzione d'organo che evolve nel malassorbimento. I soggetti maggiormente colpiti presentano gravi mutazioni di CFTR su entrambi gli alleli presentando, ad esempio, l'omozigosi di F508del, mentre coloro che hanno almeno una mutazione associata a fenotipo lieve, come R117H, riescono a mantenere in buona parte l'attività pancreatica. La diagnosi di insufficienza si basa sul dosaggio dell'attività dell'elastasi fecale 1 (EF₁) in un campione di feci fresche. Inoltre, la quantità di grassi misurata in una raccolta fecale di 72 ore, considerata anche la storia dietetica del paziente, permette di determinare anche il grado di malassorbimento ottenendo, infine, il coefficiente di assorbimento. In un soggetto sano l'assorbimento dei grassi è superiore al 93% mentre in un paziente con FC questo valore si può ridurre notevolmente. Clinicamente la maldigestione pancreatica deve essere sospettata nel momento in cui si osservano feci maleodoranti, distensione addominale, scarso accrescimento ponderale, malassorbimento delle vitamine liposolubili o iponatriemia con associazione a edema^{11,71,72}.
- *Pancreatiti:* sono causate da un'alterata secrezione acinare e duttulare che causa delle pancreatiti acute. Sono colpiti in particolar modo i soggetti adolescenti e giovani adulti con sufficienza pancreatica (il 10,3% di questi), e quindi mutazione parzialmente funzionante di CFTR, e in minima parte, 0,5%, coloro che si presentano con insufficienza. La pancreatite può essere anche la condizione mediante la quale si può porre diagnosi di FC⁷³.
- *CFRD, Cystic Fibrosis Related Diabetes:* il diabete è una comune manifestazione della FC, ma non si può correlare la sua fisiopatologia a quella dei più comuni diabete mellito di tipo 1 o 2. È infatti un'entità clinica distinta dato che non sono riconosciute delle cause autoimmuni

mentre l'alterazione che si ha alla base è data dal deficit di insulina anche se si è osservata durante le esacerbazioni polmonari o le somministrazioni di terapia steroidea un'insulino-resistenza. L'alterazione di CFTR causa secrezioni dense e spesse che creano ostruzioni dannose per la funzionalità esocrina del pancreas dando anche infiltrazione fibro-adiposa che a sua volta provoca una distruzione dell'architettura delle isole pancreatiche.

Clinicamente il diabete correlato a Fibrosi Cistica si presenta con iperglicemia, glicosuria, poliuria, e perdita di peso. L'alterato metabolismo glucidico, associato alla sua intolleranza o a diabete può contribuire al peggioramento della funzionalità polmonare e per questo è importante eseguire annualmente la curva da carico orale di glucosio (*OGTT, Oral Glucose Tolerance Test*) dopo i 10 anni. L'iperglicemia favorisce le infezioni in particolar modo quelle da *P. Aeruginosa* e da *B. Cepacia* che possono influire ancor più negativamente sulla funzionalità polmonare. Inoltre, dopo i 5 anni di terapia insulinica è utile iniziare a monitorare anche le complicanze del diabete pur non essendo stata osservata aterosclerosi è indispensabile, infatti, verificare se è presente microalbuminuria, indice di nefropatia diabetica, retinopatia, che colpisce il 10-35% dei pazienti, ipertensione arteriosa e complicanze neurologiche. Il CFRD colpisce circa il 2% dei pazienti con FC con meno di 10 anni, il 19% degli adolescenti, e più del 40% dei pazienti con più di 20 anni^{11,74}.

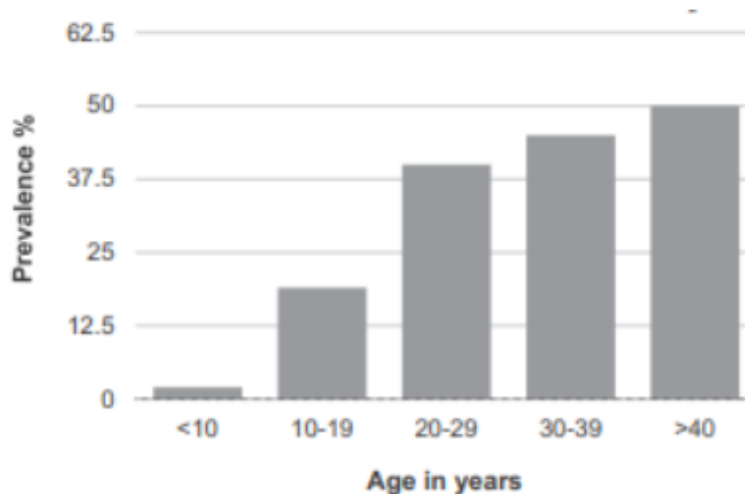


Figura 9 – prevalenza di CFRD tra gli affetti da Fibrosi Cistica⁷⁴

Apparato riproduttivo:

- È presente un ritardo dello sviluppo sessuale, anche se di soli due anni circa, soprattutto tra i pazienti affetti da patologia severa, sia tra i maschi che tra le femmine⁷⁵.
- Il 95% dei maschi affetti da FC presenta azoospermia ostruttiva a causa del difettoso trasporto di cloro a livello dell'epididimo e della possibile regressione precoce del dotto del mesonefro, o dotto di Wolff. È stata dimostrata l'assenza dei vasi deferenti (*CBAVD – assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti*), e un epididimo assente o rudimentale nell'1-2% degli uomini infertili riscontrando in questi un aumento della frequenza F508del in eterozigosi. Il 65% delle azoospermie presenta, infatti, almeno una mutazione di CFTR e solitamente il fenotipo di FC è di tipo lieve, quindi di classe IV o V. La fertilità di uomini presentanti CBAVD è spesso volte mantenuta grazie alla raccolta di sperma, aspirato per via chirurgica o percutanea, o mediante agoaspirato testicolare seguito dalla fecondazione in vitro, *ICSI (Intracytoplasmatic Sperm Injection)*^{45,76}.
- Gli uomini presentano un aumento dell'incidenza di ernia inguinale, idrocele, criptorchidismo.
- Le donne hanno una fertilità ridotta del 20% rispetto alle coetanee a causa della maggior viscosità del muco cervicale che intrappolerà e non favorirà la risalita degli spermatozoi e della scarsa concentrazione di bicarbonato contenuto in questo, necessario alla loro capacitazione. È possibile, inoltre, riscontrare un aumento di amenorrea secondaria in particolar modo in situazioni di elevato stress o di esacerbazione delle infezioni polmonari^{3,11,76}.
- Le donne affette da FC in età fertile possono avere una gravidanza senza incorrere in un rilevante declino funzionale polmonare, e senza avere un aumento della mortalità previo il controllo e la stabilità delle condizioni generali di base. Le pazienti che riescono infatti a portare a termine la gravidanza presentano solitamente un fenotipo lieve di malattia, e non sono generalmente omozigoti per F508del, inoltre, in queste pazienti l'ostruzione bronchiale è di tipo moderato con $FEV_1 > 50-60\%$ del valore predetto. Il rischio di nascita prematura è presente nel 10-45% dei casi e aumenta con il riscontro di diabete pregestazionale e di una riduzione della

funzione polmonare. In ogni caso le pazienti affette da FC sono sempre da considerarsi a rischio e per questo è indispensabile una pianificazione della gravidanza e un intenso monitoraggio delle condizioni generali della donna in particolar modo per quanto concerne le esacerbazioni polmonari e le ospedalizzazioni. Nelle donne che presentano una malattia grave, con $FEV_1 < 50\%$ è prudente sconsigliare l'avvio di una gravidanza in quanto il rischio di scarso stato nutrizionale, il diabete mellito insulino-dipendente, e le infezioni da B. Cepacia associate alla scarsa funzionalità polmonare potrebbero ulteriormente aggravarsi durante la gestazione. La valutazione del FEV_1 , prima di intraprendere una gravidanza, risulta quindi essenziale per rendere consapevole la paziente dei rischi e per predirne l'outcome^{77,78}.

Apparato urinario: tra il 30% e il 68% delle donne affette da FC sono colpite da incontinenza urinaria mentre gli uomini sono colpiti tra il 3% e il 16%. Tra le bambine e le adolescenti affette invece la prevalenza è del 19-47%, mentre nella popolazione sana dell'8-13%. Questa manifestazione, quindi, è sicuramente rilevante in quanto rappresenta un motivo di angoscia e di ansia in molti pazienti e impatta in modo importante sullo stile e sulla qualità di vita. La causa principale viene riconosciuta a livello dell'apparato respiratorio in quanto la tosse provoca un indebolimento del pavimento pelvico, inoltre, a livello renale l'alterazione del CFTR, in particolare a livello del tubulo contorto distale e prossimale, induce l'ossidazione delle proteine, l'infiammazione, e l'accelerazione del processo di senescenza, rendendo inoltre anomalo il processo di riparazione tissutale. Non è stato ancora individuato un trattamento efficace per far fronte a questa patologia, anche se si è visto un miglioramento con gli esercizi del pavimento pelvico. È in aumento, inoltre, la causa secondaria di patologia renale, in particolare favorita da infezioni croniche, da diabete, da malattia vascolare, complicanze tipiche della Fibrosi Cistica, che vanno ad accentuare l'incontinenza urinaria. I pazienti, inoltre, essendo sottoposti a terapia farmacologica quotidianamente sin dai primi giorni di vita, sono esposti ad un rischio aumentato di insufficienza renale acuta o cronica data dall'assunzione di agenti nefrotossici differenti, come gli aminoglicosidi, gli immunosoppressori e i FANS ad esempio^{79, 80, 81}.

Ghiandole sudoripare: CFTR è presente anche nelle ghiandole sudoripare ed è responsabile del riassorbimento del cloruro a livello delle cellule del dotto escretore. Data l'alterazione del canale transmembrana si verrà a manifestare un'incapacità di riassorbimento degli ioni cloruro escreti, che assieme al sodio, si accumuleranno nel dotto escretore. L'eccessiva perdita di sale attraverso il sudore, soprattutto in età pediatrica, espone il bambino ad episodi di squilibri elettrolitici, in particolare in situazioni di eccessivo caldo, o di aumentata perdita, ad esempio, causata da gastroenterite. Le alterazioni a livello delle ghiandole sudoripare, essendo particolarmente caratteristiche, inoltre, sono utilizzate per la diagnosi della Fibrosi Cistica mediante il test del sudore^{11, 82}.

Apparato osteo-articolare: le principali patologie che si vengono a manifestare sono l'osteopenia e l'osteoporosi causa del 15% delle fratture a livello della colonna vertebrale. Il 50-75% degli adulti affetti da Fibrosi Cistica presenta una ridotta densità ossea dimostrando l'importanza di questa manifestazione per tale patologia. La malattia osteo-articolare ha cause multifattoriali includenti fattori genetici, alterato stato nutrizionale, squilibri ormonali, terapia steroidea, interleuchine prodotte dal processo di infezione-infiammazione sempre presente a livello polmonare. La densità minerale ossea (*BMD, Bone Mineral Density*) si presenta bassa sin dai primi anni nonostante il bambino abbia, ad esempio, malattia lieve e in quel momento non evidenzi un deficit nutrizionale, negli adolescenti e ancor più nei pazienti adulti la ridotta BMD sarà invece più marcata. Nel 5% degli affetti da patologia polmonare grave è possibile inoltre riscontrare, anche osteoartropatia ipertrofica, una condizione associata anche a periostite delle ossa lunghe sia a livello degli arti inferiori che superiori visualizzabile radiologicamente, in cui si rileva il rimaneggiamento osseo associato alla sua nuova formazione separatamente dalla corteccia sottostante^{11, 83, 84}.

Trombosi venosa: i soggetti affetti da Fibrosi Cistica sono maggiormente predisposti a manifestare TEV, che può colpire anche i bambini, comportando una mortalità e una morbidità significativa. Le cause di questo aumentato rischio sono da ricercare nel rilevante utilizzo di cateteri venosi centrali (CVC), nella trombofilia acquisita secondaria all'infiammazione sempre presente, nella carenza di vitamina K e nella disfunzione epatica dalla quale deriva, inoltre, anche il

deficit di proteine anticoagulanti. Gli affetti da Fibrosi Cistica hanno una prevalenza maggiore rispetto alla popolazione generale di *Lupus Anticoagulant* e una riduzione della sintesi di proteine C e S anche se non è stata ancora rilevata alcuna evidente correlazione con uno genotipo specifico e le cause al momento non appaiono ancora ben determinate^{85, 86, 87}.

Sintomi ansioso-depressivi: la fibrosi cistica, malattia genetica autosomica recessiva, condiziona tutta la vita del soggetto, ma anche della famiglia modificandone le relazioni e gli equilibri. Considerate queste premesse si deve sottolineare come la correlazione con lo stato e l'evoluzione della malattia, ma anche l'armonia domestica o le pressioni che da questa si possano avere, oltre alla percezione e all'accettazione all'interno della società influenzino il paziente. I sintomi ansioso-depressivi hanno una prevalenza del 15-25% tra gli adulti affetti da FC aumentando in età adolescenziale per poi stabilizzarsi in un secondo momento. Tra coloro che manifestano ansia e depressione, il 41,6%, è affetto da entrambe e a volte il supporto psicologico non risulta sufficiente, ma si rende necessaria anche una terapia medica di supporto^{15, 88}.

1.1.8 Terapia

La Fibrosi Cistica è una patologia complessa e deve essere gestita da un team multidisciplinare specializzato che abbia in carico il paziente durante la crescita, ma anche nell'età adulta dato che questa malattia non viene più considerata solo come una patologia pediatrica, in quanto la sopravvivenza media è aumentata notevolmente. Il costante monitoraggio degli affetti permette di valutare il miglioramento o il peggioramento delle manifestazioni della patologia e di correggerne le terapie in modo continuo, ma allo stesso tempo fa in modo che costoro si sentano seguiti da un personale attento e sensibile alle loro problematiche. Le indicazioni terapeutiche si rivolgono alla riduzione della sintomatologia, ma non alla cura definitiva della Fibrosi Cistica; lo scopo, quindi, è quello di mantenere stabile la condizione per periodi il più lungo possibili.

1.1.8.1 Apparato respiratorio

Nel 2013 la *CFF (Cystic Fibrosis Foundation)* per mezzo della *Pulmonary Clinical Practice Guidelines Committee* ha aggiornato e meglio definito le raccomandazioni terapeutiche per il trattamento di questa patologia in particolar modo per gli affetti con più di 6 anni.

I farmaci su cui si basa il trattamento per la malattia polmonare sono:

- *Mucolitici*: la principale terapia facente parte di questa classe, è il *Dornase Alfa*, una deossiribonucleasi umana purificata ricombinante (RhDNAsi).

Questo enzima ha la funzione di idrolizzare il DNA extracellulare presente a livello dell'espettorato delle vie aeree derivante dall'infiammazione polmonare e dall'accumulo di materiale genetico che proviene dalla rottura dei neutrofili e che aumenta notevolmente la viscosità del muco. Questa RhDNAsi ha fornito ottimi risultati sia per i pazienti con patologia polmonare severa con livello di evidenza buono, beneficio netto sostanziale e grado di raccomandazione A, sia per coloro che hanno malattia lieve o asintomatica, con livello di evidenza buono, beneficio netto moderato e grado di raccomandazione B. In questi ultimi, nonostante la funzionalità polmonare non risultasse ancora particolarmente compromessa, si è potuto osservare un aumento anche di dieci percentili di BMI soprattutto se la terapia veniva iniziata prima dei due anni di età. Un altro mucolitico che può essere utilizzato è l'*N-Acetilcisteina (NAC)* che ha la funzione di aumentare i livelli di glutathione proteggendo il tessuto polmonare dai danni mediante la sua funzione antiossidante intracellulare. A differenza del Dornase Alfa, però, questo farmaco non è fortemente raccomandato in quanto le evidenze non sono così rilevanti.

- *Antibiotici*: questi farmaci vengono utilizzati in modo importante dai pazienti affetti da Fibrosi Cistica, sia con funzione di profilassi, sia per eradicare le infezioni e controllare le possibili colonizzazioni. I patogeni hanno diverso grado di prevalenza a seconda dell'età, in particolar modo tra i bambini si riscontra lo *Staphylococcus Aureus (SA)* e l'*Haemophilus Influenzae*, mentre tra gli adolescenti e gli adulti lo *Pseudomonas*

Aeruginosa (PA). I pazienti continuamente sottoposti ad un quadro infettivo importante di tipo acuto diventano poi colonizzati stabilmente, ad esempio lo PA in età pediatrica ha una prevalenza del 15,2%, mentre tra gli adulti del 52,1%. Lo SA invece è presente nel 52,8% dei bambini, e il 53,2 degli adulti; un patogeno a cui si pone particolare attenzione, soprattutto per le implicazioni a cui porta questa colonizzazione, è la *Burkholderia Cepacia Complex* che tra gli adulti affetti è presente nel 4,3% dei casi. Lo *Stenotrophomonas Malthophilia*, infine, è presente nel 4,9% dei bambini, e nel 6,1% degli adulti.

- *Profilassi*. Le attuali linee guida europee raccomandano l'utilizzo di antibiotici verso lo SA dal momento della diagnosi fino ai tre anni di età per ridurre il rischio di colonizzazione dello MSSA (*Staphilococcus Aureus Methicillin Susceptible*) anche se non è stata confermata la correlazione del miglioramento clinico. Il comitato americano invece, non raccomanda l'utilizzo di terapia profilattica anti-SA sottolineando la necessità di sostenere ulteriori studi in merito.
- *Eradicazione precoce di un'infezione*. Il monitoraggio continuo della funzionalità polmonare e delle colture di espettorato e del relativo antibiogramma consentono al medico di prescrivere il prima possibile, quindi quando si è ancora in una fase acuta, l'antibiotico più adatto. Lo PA, ad esempio, è un Gram negativo, che deve venir eradicato il prima possibile in quanto il rischio di cronicizzazione a livello delle basse vie aeree è alto, e considerando che questo causa poi un lento declino della funzionalità polmonare è necessario prestare particolare attenzione. Le dosi per questi pazienti, rispetto ai non affetti da FC, è maggiore in quanto il volume di distribuzione del farmaco, ma anche la clearance renale sono differenti. Solitamente la somministrazione della terapia può avvenire per via sistemica, per via orale o mediante inalazione. Vista l'alta concentrazione che si può raggiungere attraverso quest'ultima via nel sito di infezione, la prima scelta terapeutica per lo *Pseudomonas Aeruginosa* è proprio la *Tobramicina* inalata che raggiunge direttamente lo strato di

muco infetto a livello delle vie aeree inferiori. Le linee guida più recenti hanno indicato in caso di resistenza, o di non responsività alla *Tobramicina*, l'utilizzo di *Piperacillina/Tazobactam* o *Ceftazidime*, ed in terza linea la *Ciprofloxacina* e la *Levofloxacina*. Si sta studiando poi in Europa, l'efficienza dell'associazione di antibiotici per via endovenosa o per via orale, con le inalazioni di un vecchio farmaco quale la *Colistina* in quanto sembrerebbe poter ridurre il rischio di colonizzazione da parte dello PA^{11, 41, 90-93}.

- *Controllo di un'infezione cronica.* La cronicizzazione a livello delle vie aeree instaura un persistente meccanismo di infiammazione, e la terapia che si va a cercare in questo caso ha la funzione di spegnere, o almeno ridurre notevolmente questo processo. Anche in questa situazione le vie di somministrazione sono differenti, ma data la lunga durata della terapia si devono tenere in considerazione anche gli effetti collaterali che potrebbero ridurre la compliance. La via sistemica richiede un quantitativo maggiore di farmaco per raggiungere la concentrazione utile a livello delle vie aeree, rispetto alla via inalatoria, con il rischio di causare insufficienza renale o ipoacusia con l'uso di aminoglicosidi, o di sviluppare resistenze con i fluorochinoloni magari non raggiungendo l'obiettivo sperato. La via di somministrazione inalatoria, invece, viene solitamente preferita alla sistemica dato che gli svantaggi che si presentano sono più contenuti, e possono essere rappresentati ad esempio dal gusto del farmaco, talvolta sgradevole, o da una potenziale reazione di broncospasmo che può però essere prevenuta da un pre-trattamento. Le formulazioni fino ad ora utilizzate sono costituite da polvere secca, e questo, assieme ai tempi richiesti per la nebulizzazione, può ridurre la compliance del paziente. Stanno ora entrando in commercio, invece, degli inalatori che riducono notevolmente i tempi di somministrazione e che richiedono una manutenzione più contenuta, pur mantenendo, secondo gli studi la medesima efficacia dei precedenti. Gli antibiotici più

frequentemente utilizzati sono la *Tobramicina*, la *Colistina*, e l'*Aztreonam*. La cronicizzazione viene solitamente trattata a periodi alterni di tipo on-off, variando anche il tipo di farmaco in modo tale da non ridurre la sua efficacia e da non crearne resistenze. Si stanno conducendo diversi studi per il controllo delle cronicizzazioni delle patologie che prendono in considerazione differenti farmaci come, ad esempio, l'*Amikacina* in formulazione liposomiale che ne permette l'attivazione diretta a livello delle basse vie aeree sullo strato mucoso su cui si trovano i patogeni, la *Levofloxacin*a inalatoria o la combinazione di *Fosfomicina* e *Tobramicina* che stanno avendo buoni risultati nei trial⁹⁰.

- *Esacerbazioni*. Possono presentarsi con una sintomatologia molto varia ma portano comunque ad un peggioramento della funzionalità polmonare. È possibile isolare i differenti patogeni mediante l'analisi dell'espettorato in cui molto spesso si rilevano più microrganismi. La riacutizzazione della patologia è causata invece dall'aumentata espressione di virulenza o dalla maggiore risposta del sistema immunitario dell'ospite, non dalla variabilità e da nuovi patogeni coinvolti. Le linee guida suggeriscono di impostare una terapia antibiotica sulla base dell'antibiogramma fatto sulla cultura dell'escreato che viene effettuato ad ogni visita trimestrale periodica. I pazienti presentando sempre gli stessi patogeni, durante l'esacerbazione con ogni probabilità avranno un'incisività della patologia aumentata, ma non una diversa origine di questa, quindi la terapia farmacologica deve essere impostata anche prima dell'esito dell'antibiogramma fatto nella situazione acuta, e si baserà in un primo momento sui risultati dell'ultima visita.

Lo *Stafilococco Aureo Meticillino-Resistente (MRSA)* è un patogeno presente a livello delle basse vie aeree nel 26% degli affetti da Fibrosi Cistica e la sua prevalenza sembra essere in aumento. È associato ad una importante riduzione della funzionalità polmonare comportando un aumento della mortalità. Lo MSSA (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) diventa MRSA nel momento in cui acquista una *SCCmec*, ovvero una *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*, una

porzione genomica che codifica appunto per la resistenza alla penicillina. Sono state identificate per il momento undici varianti di SCCmec a livello dell'escreato e queste sono correlate con il numero di esacerbazioni e necessità di trattamento antibiotico, per questa ragione si sta ipotizzando di tipizzare la colonizzazione nel momento in cui questa viene riconosciuta per provare ad eradicare il patogeno nel modo più mirato possibile. Nel momento in cui si presenta l'MRSA nell'escreato si deve utilizzare la *Vancomicina* come terapia a differenza invece dell'MSSA che, essendo sensibile alle penicilline, permette il trattamento per via orale con *Nafcillina* o *Oxacillina* come prima scelta, oppure *Cefazolina* per via parenterale^{90, 95, 96, 97}.

Un altro patogeno riscontrabile a livello delle vie aeree è la *Burkholderia Cepacia* che si associa ad un aumento di mortalità importante, del 62% all'anno, e in cui la cronicizzazione è frequente. Per questo batterio il trattamento risulta complesso, ma solitamente a livello dell'antibiogramma si ha una sensibilità per il *Cotrimossazolo* o il *Cloramfenicolo*, mentre non sembrano trarre beneficio dall'uso dell'*Aztreonam* inalatorio^{90, 99}.

I *micobatteri non tubercolari (NTM)* sono poco presenti nella popolazione generale, ma si rilevano nell'1,2% degli adulti affetti da Fibrosi Cistica e nello 0,4% dei bambini. Tra i NTM i più comuni sono il *Mycobacterium Avium Complex*, e il *Mycobacterium Abscessus*, quest'ultimo è indicativo di una prognosi sicuramente peggiore per il paziente e richiede una terapia importante. Secondo le linee guida il trattamento proposto per i NTM prevede una fase di induzione di 1-3 mesi a base di un macrolide somministrato per via orale, e di due antibiotici, tra cui l'*Amikacina* per via endovenosa. La fase di mantenimento prevede invece la nebulizzazione di Amikacina associata a due o tre antibiotici per via orale, tra cui un macrolide che dovrà essere continuato per un anno dalla negativizzazione della coltura. L'infezione potrebbe diventare cronica e in questo caso, nel momento in cui il paziente riuscisse a tollerare la terapia senza particolari effetti collaterali, si consiglierebbe di proseguire il trattamento al fine di ridurre il rischio di progressione della malattia polmonare^{90, 91, 100}.

- *Antimicotici*: il fungo che si manifesta maggiormente a livello delle vie aeree nei pazienti affetti da FC è l'*Aspergillus Fumigatus* che può dare anche una pneumopatia immunologica detta Aspergillosi

Broncopolmonare Allergica (ABPA). Il trattamento che viene suggerito si basa su antifungini quali l'*Itraconazolo*, il *Voriconazolo*, il *Posaconazolo*, il *Ketoconazolo*, la *Nistatina* e l'*Amfotericina B* che però hanno importanti effetti collaterali a livello cutaneo come reazioni di fotosensibilità e di grave epatotossicità. L'ABPA invece viene trattata sempre mediante antifungini, associati ad un potente antiinfiammatorio quale il Metilprednisone, inoltre è stato recentemente introdotto anche un nuovo farmaco monoclonale, Omalizumab, che ha un'attività di tipo anti-IgE⁹⁰,¹⁰⁰.

- *Reidratazione delle superfici delle vie aeree*: è possibile migliorare la clearance mucociliare delle vie aeree aumentandone l'idratazione mediante l'inalazione di *soluzione salina ipertonica* (HS). Il paziente assume questa terapia in particolare durante l'attività fisica o la fisioterapia respiratoria in quanto è stato dimostrato che, oltre a renderla più efficace, viene percepita dal paziente con una sostanziale sensazione di benessere. La soluzione iperosmolare per effetto osmotico aumenta l'idratazione del muco, facilitandone quindi la sua rimozione e con essa i patogeni sovrastanti. La soluzione salina ipertonica può causare broncocostrizione una volta inalata e per questo solitamente alla sua assunzione si associa quella di un broncodilatatore. È stato condotto presso il Centro di Fibrosi Cistica di Treviso uno studio retrospettivo in cui sono stati presi due gruppi differenti e si è confrontato l'utilizzo della sola soluzione salina al 7% oppure la sua associazione all'*acido ialuronico*, un polisaccaride presente nei tessuti umani somministrato sempre per via inalatoria. L'HA ha la capacità di ridurre notevolmente la broncocostrizione acuta causata dalle elastasi dei neutrofili ed inoltre permette di facilitare la ventilazione e lo scambio di gas regolando i fluidi a livello dell'interstizio polmonare. In conclusione, questo studio ha evidenziato come la sola soluzione ipertonica permetta di diminuire la necessità di terapia antibiotica endovenosa, mentre l'associazione HS e HA riduca anche la necessità di terapia orale. L'idratazione delle vie aeree, in ogni caso, permette di rallentare l'inevitabile progressione della malattia^{90, 102, 103}.

Un altro farmaco che può essere utilizzato per reidratare la mucosa delle vie aeree è il *mannitolo* che proprio per la sua capacità di creare un

gradiente osmotico a livello della superficie, va a favorire la clearance mucociliare. Tra i pazienti che seguono questa terapia si è visto un miglioramento della FEV₁ e quindi della funzionalità respiratoria, e parallelamente una riduzione delle esacerbazioni, in particolar modo quando viene associato l'uso di un mucolitico. Si sono osservati comunque degli effetti collaterali, quali emottisi e aumento della tosse, ragione per cui le linee guida consigliano la prescrizione del mannitolo solo ai pazienti che riescono a tollerarlo, altrimenti è consigliabile provare un approccio con l'uso di soluzione ipertonica e di acido ialuronico ad esempio^{90, 104}.

Sono stati condotti degli studi denominati *TIGER1* e *TIGER2*, basati sull'utilizzo di un antagonista del recettore purinergico di P2Y₂ denominato *Denufosolo Tetrasodico*, che proprio per la sua capacità di stimolare la secrezione di cloruro a livello del canale CFTR avrebbe dovuto portare un potenziale beneficio ai pazienti affetti da Fibrosi Cistica. Tuttavia, gli studi si sono dimostrati inconcludenti, e non si è visto anzi un effettivo beneficio motivo per si è deciso di abbandonare questa terapia^{90,105}.

È stato testato anche un diuretico risparmiatore di potassio, ossia l'*Amiloride*, partendo dall'osservazione teorica dell'alterazione di CFTR e dell'inibizione di ENaC, dato che appunto poteva apparire una buona opzione terapeutica. Per questa ragione si sta testando in un trial una molecola al momento denominata P-1037 avente la funzione di bloccare ENaC a livello polmonare⁹⁰.

- *Antinfiammatori*: considerando che la funzionalità polmonare viene alterata in buona parte dal meccanismo infiammatorio che viene attivato proprio a livello delle vie aeree si era inizialmente pensato di utilizzare i *corticosteroidi* per via sistemica orale in un primo momento, ma anche per via inalatoria in seguito. Gli studi hanno però dimostrato che questi sono poco utili a fronte invece di una quantità consistente di effetti collaterali e per questo la loro raccomandazione per ridurre le esacerbazioni e aumentare la funzionalità polmonare è di livello basso, D.

Gli antinfiammatori non steroidei, invece, in particolar modo l'*Ibuprofene*, hanno dato dei risultati soddisfacenti per i pazienti giovani, aventi un'alterazione polmonare di tipo lieve. Per gli affetti tra i 6 e i 17 anni con

una $FEV_1 \geq 60\%$ del predetto, allo scopo di rallentare il peggioramento della funzionalità polmonare, è raccomandato con evidenza discreta e beneficio netto moderato, di livello B, l'utilizzo di questo FANS mantenendo la concentrazione ematica all'interno dell'intervallo tra i 50 $\mu\text{g/ml}$ e i 100 $\mu\text{g/ml}$. Per i pazienti invece sopra questa soglia di età non sono stati condotti studi che raccomandino o meno l'utilizzo di Ibuprofene^{90, 106}.

Gli antagonisti del recettore del leucotriene B₄ inibiscono questo mediatore prodotto dai macrofagi e dai neutrofili e per questo poteva teoricamente essere considerato utile nella Fibrosi Cistica, ma gli effetti collaterali molto importanti, tra cui l'aumento della frequenza di riacutizzazioni fanno desistere il suo uso^{90, 107}.

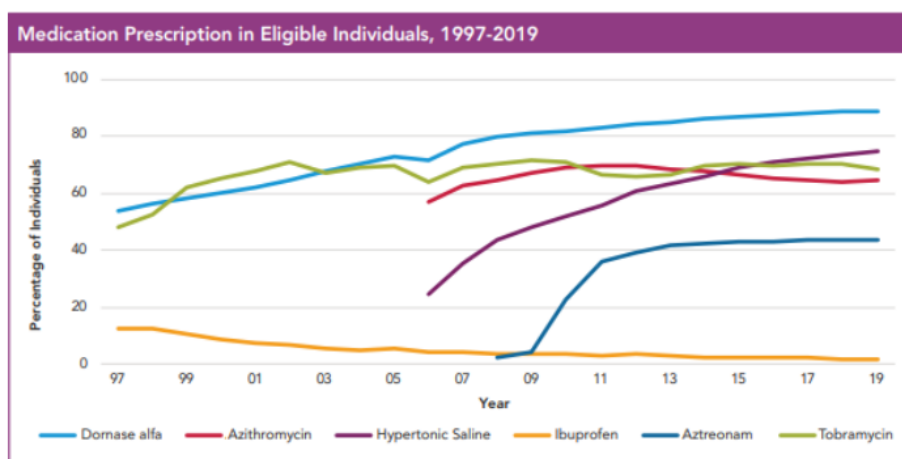


Figura 10 – terapie prescrivibili nel periodo 1997-2019 e percentuale di pazienti che ne fanno uso¹⁰⁹

1.1.8.2 Tratto gastrointestinale

Sono stati condotti diversi studi per sviluppare strategie efficaci nel far fronte alle manifestazioni e alle complicanze gastroenteriche che si sono rivelati davvero molto utili per migliorare la qualità dei pazienti.

- *PERT, Enzimi pancreatici*: il pancreas è un organo spesso colpito dalla FC, perciò molti pazienti necessitano di una terapia sostitutiva. La dose consigliata cambia in base alle esigenze del paziente, partendo da questo

presupposto nei bambini con meno di due anni le raccomandazioni suggeriscono di fare un dosaggio delle elastasi fecali per stimare la reale disfunzione pancreatica al fine di somministrare la corretta supplementazione enzimatica dato che il rischio di malnutrizione è rilevante. Nei bambini sopra i due anni la dose raccomandata, invece, è di 2500 unità di lipasi/kg/pasto per un totale di 10000 unità di lipasi/kg/giorno circa^{71,108}.

- *Vitamine e Sali Minerali*: a causa del malassorbimento comune in questi pazienti si deve porre attenzione al dosaggio delle vitamine liposolubili (A, D, E, K) che potrebbero essere carenti dando difetti di mineralizzazione (deficit di vitamina D) o alterazione della coagulazione (deficit di vitamina K). Un'altra carenza che viene frequentemente riscontrata in questi pazienti è quella di ferro che causa un'anemia ferropriva, dovuta principalmente all'infiammazione cronica. I Sali minerali invece su cui si deve prestare maggiore attenzione tra gli affetti da Fibrosi Cistica sono lo zinco, il calcio, il magnesio e il selenio anche se il loro alterato dosaggio non viene riscontrato troppo spesso. Data l'alterazione dei canali ENaC infine, bisogna raccomandare un'idratazione adeguata allo scopo di bilanciare gli elettroliti nel miglior modo^{71, 108}.
- *Antiacidi*: per aumentare l'assorbimento della terapia sostitutiva PERT, e per trattare il reflusso gastroesofageo (GERD) molto comune tra gli affetti da Fibrosi Cistica, vengono comunemente prescritti degli antiacidi oppure degli inibitori di pompa protonica. I primi sono maggiormente prescritti nei soggetti con meno di 20 anni, mentre i secondi principalmente per coloro che hanno più di 20 anni^{90, 109}.
- *Acido ursodesossicolico*: la disfunzione epatica associata alla cirrosi può giovare di questa terapia anche se ciò non è stato chiaramente dimostrato.
- *Terapia insulinica sostitutiva o con ipoglicemizzanti orali*: gli affetti da FC presentano spesso una degenerazione del parenchima pancreatico e per questo sviluppano diabete FC-correlato e a cui seguono sia le complicanze classiche che il declino della funzionalità respiratoria e l'aumento della mortalità. Si manifesta solitamente tra coloro che presentano mutazioni più severe, appartenenti quindi alle classi I, II, III, presentandosi quindi, nel 31% dei pazienti con più di 18 anni. I soggetti portatori, quindi,

periodicamente saranno monitorati attraverso il test di tolleranza glucidica (OGTT) e mediante l'analisi dell'emoglobina glicata (HbA1c). In caso di diagnosi di CFRD è necessario intraprendere la miglior terapia, infatti se il soggetto fosse ancora in una fase di intolleranza glucidica potrebbe giovare di una terapia orale con Metformina, Repaglinide, antagonisti di GLP1 o inibitori di DPP4, mentre in caso di diabete conclamato si deve ricorrere all'insulina^{90, 114}.

1.1.8.3 Trattamenti non farmacologici

Questo tipo di trattamenti sono molto utili ed eseguiti il più spesso possibile dai pazienti in quanto il beneficio che apportano è rilevante.

- *Fisioterapia respiratoria*: gli esercizi per favorire la clearance delle vie aeree sono caldamente prescritti a tutti i pazienti affetti da Fibrosi Cistica in quanto possono favorire il movimento muco-ciliare e in secondo luogo quindi l'eliminazione dei microrganismi. La clearance può venire favorita dalla tosse volontaria, dalle ripetute manovre espiratorie forzate che possono essere associate a pressione espiratoria positiva o all'utilizzo di una serie di dispositivi oscillatori. Le sedute di fisioterapia vengono raccomandate 1-4 volte al giorno in base alla disfunzione polmonare del paziente e all'acuzie del momento e i pazienti possono fare uso anche di diverse strumentazioni meccaniche come la maschera PEP, Flutter, Percussionaire, Acapella, VEST o Ventilazione Non Invasiva. Nel paragonare le diverse metodiche che possono venir applicate, nessuna di queste si è dimostrata fortemente superiore rispetto alle altre, ma allo stesso tempo, si è visto che l'utilizzo della PEP riduce il numero delle riacutizzazioni polmonari e per questo può esserne favorito il suo uso. I pazienti rispondono in modo soggettivo alle terapie proposte e per questa ragione, talvolta, è utile applicarle per periodi differenti o associarle in vario modo tra di loro^{90, 110, 111}.
- *Supporto ventilatorio notturno con BiPAP*: la ventilazione notturna mediante BiPAP si è dimostrata efficace nel fornire una stabilità respiratoria a lungo termine. L'ipotesi attualmente accreditata si basa sul fatto che durante la notte il dispositivo permetta un'espansione degli

alveoli polmonari danneggiati, e quindi predisponga ad un aumento della funzionalità residua che si ripercuoterà durante la giornata e a lungo termine sulla progressione della malattia¹¹². L'uso della NIV è sempre più comune, inoltre, tra i soggetti affetti da FC severa dato che spesso è presente ipoventilazione importante e insufficienza respiratoria grave, il paziente con buona probabilità potrebbe essere inserito in lista per ricevere un trapianto polmonare, e questo dispositivo nella fase di attesa potrebbe essere utilizzato con buon profitto¹¹.

- *Esercizio fisico aerobico*: l'attività motoria viene prescritta ai pazienti alla stregua della terapia farmacologica, sia ai bambini, che agli adulti. I benefici

che vengono apportati sono dovuti ad una migliore distribuzione polmonare dell'aria inspirata, ad un aumento del flusso espiratorio e ad uno stimolo della clearance mucociliare che non si rilevano solamente nel breve periodo, ma anche nel lungo rallentando la progressione della malattia polmonare stessa e riducendo quindi la mortalità^{11, 111, 113}.

1.1.8.4 Trapianto Polmonare

Questa opzione terapeutica è stata introdotta nel 1988 e rappresenta un mezzo per migliorare la sopravvivenza e la qualità di vita degli affetti allo stadio terminale in cui l'aspettativa di vita a 5 anni è inferiore al 30%. I pazienti candidati alla chirurgia, e quindi richiedenti un trapianto, sono molti di più di quanti effettivamente ne beneficino ogni anno, e solitamente i riceventi hanno più di 30 anni. La richiesta d'organo eccede quindi di molto l'offerta e i tempi in cui i soggetti rimangono in lista trapianto sono molto rilevanti. Tra il 15% e il 41% dei pazienti giunge ad exitus durante l'attesa dell'intervento^{90, 115}. I soggetti che possono giovare del trapianto bipolmonare hanno la $FEV_1 < 30\%$, anche se uno studio condotto nel Regno Unito ha dimostrato che più del 50% degli individui con queste caratteristiche sopravvive per più di 5,3 anni facendo riconsiderare questo target come possibile soglia non ideale¹¹⁶. La Fibrosi Cistica è al secondo posto tra le indicazioni al trapianto bipolmonare (il 16% di questi avvengono in affetti da FC), ma rappresenta anche la seconda causa di morte tra i malati, con una percentuale del 50% a 5 anni. Le complicanze che possono susseguirsi infatti

a questa chirurgia includono il rigetto acuto e cronico, le infezioni opportunistiche e le manifestazioni secondarie all'immunosoppressione cronica importante, tra cui le neoplasie. Nel 2020, a causa della pandemia da Sars-COV2, il trend positivo che si era osservato negli ultimi periodi ha avuto un brusco calo negativo nella donazione, registrando in Italia 115 trapianti di polmone, con una riduzione del 24,8% rispetto all'anno precedente e parallelamente anche tra i secondi maggiori riceventi, ovvero gli affetti da FC₁₁₇. In seguito a questo periodo pandemico, inoltre, i tempi di attesa in lista trapianto si sono allungati ulteriormente^{90, 15-117}.

1.1.8.5 Nuove possibilità terapeutiche

Grazie allo studio della fisiopatologia della Fibrosi Cistica, e in particolare alla scoperta dei meccanismi che sottendono lo sviluppo delle alterazioni a livello polmonare, si stanno ricercando nuove strategie terapeutiche da attuare in modo da rendere la cura sempre meno palliativa e auspicando un'aspettativa e una qualità di vita decisamente migliori.

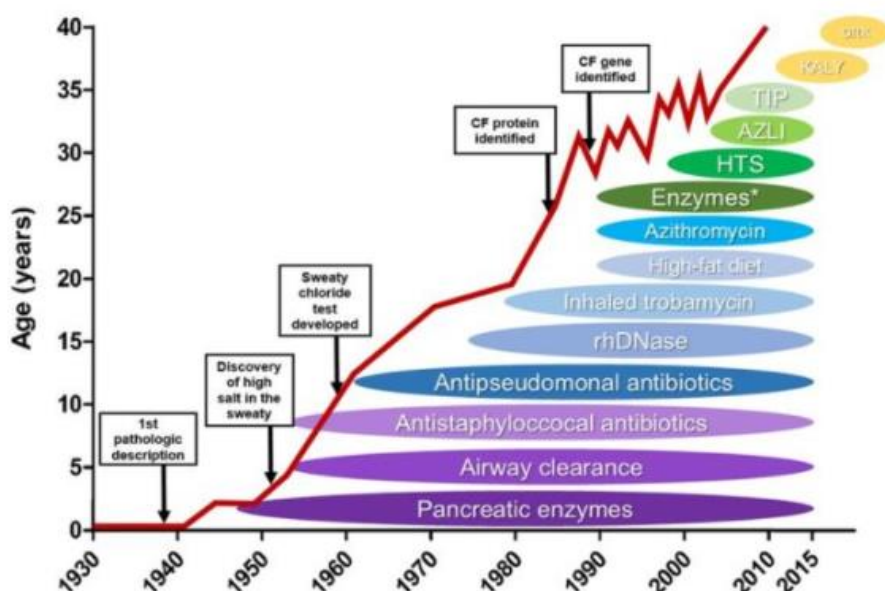


Figura 11 – beneficio apportato dalle nuove terapie sull'aspettativa di vita dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica³¹

Nel 2012 venne ufficialmente approvata la prima terapia basata su una molecola indirizzata direttamente verso il difetto del CFTR, *Ivacaftor*. Questo farmaco si è rivelato particolarmente efficace per i pazienti portatori della mutazione

Gly551Asp in cui aveva la capacità di potenziare il canale transmembrana. Questo difetto genetico è presente però solo nel 7% della popolazione, quindi il nuovo trattamento non poteva essere considerato soddisfacente per tutti gli affetti da Fibrosi Cistica^{19, 123}.

Sono stati sviluppati, essenzialmente due tipi di modulatori complementari tra loro, che permettono di aumentare la secrezione di anioni attraverso il canale CFTR:

- I *Potenziatori*, tra cui *Ivacaftor*, la cui funzione è quella di aumentare la probabilità di apertura del CFTR sulla superficie cellulare e di favorire il trasporto ionico. Questi farmaci sono efficaci nel trattare prevalentemente le mutazioni definite di “*gating*”;
- I *Correttori*, tra cui *Lumacaftor*, *Tezacaftor* ed *Elexacaftor*, che aumentano la produzione della proteina intracellulare, sia nella forma mutata che nella forma corretta, rendendola funzionante, almeno in parte, sulla superficie cellulare¹²³.

I pazienti elegibili alla terapia con modulatori corrispondono all’80,5% degli affetti da Fibrosi Cistica, il 10% circa della popolazione presa in esame, infatti, è composta da pazienti di un’età inferiore rispetto agli studi di sicurezza condotti, il restante 9,5% ha invece delle mutazioni che permettono una funzionalità residua di CFTR, o presentano alterazioni non ben definite dai pannelli di screening, oppure non sembrano essere responsivi ai modulatori attualmente in studio¹⁰⁹.

Il numero di pazienti elegibili alla terapia con modulatori non corrisponde al numero di coloro che ne fanno effettivamente uso, ma questo dato sta sostanzialmente aumentando grazie alle evidenze mostrate dagli ultimi studi e al reale beneficio che questi possono trarre dall’uso dei nuovi modulatori. *Ivacaftor* viene assunto dal 93,2% dei soggetti portatori della mutazione G551D, e dal 63,2% di coloro che hanno un’alterazione di R117H. Lumacaftor+Ivacaftor è prescritto al 41,1% dei pazienti elegibili, ma questo dato verrà notevolmente ridotto con l’adozione della terapia a base di Tezacaftor+Ivacaftor e della triplice terapia Elexacaftor+Tezacaftor+Ivacaftor approvata dall’FDA alla fine del 2019¹⁰⁹.

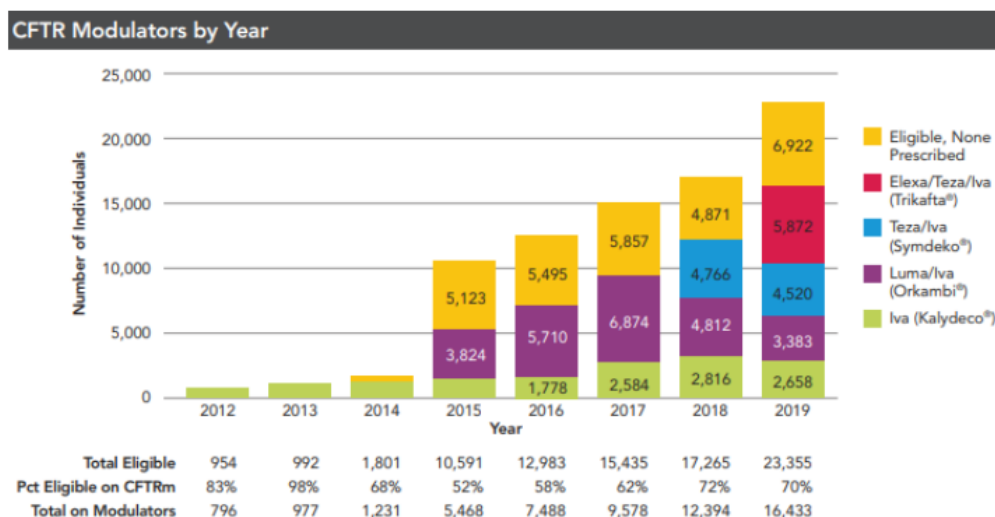


Figura 12 – Terapie con modulatori prescritte per anno¹⁰⁹

1.1.9 Prognosi

La Fibrosi Cistica, essendo una patologia genetica, quando è stata descritta per la prima volta nel 1935, portava ad exitus già nel periodo neonatale a causa principalmente dell'insufficienza pancreatica e della malnutrizione che spesso comporta. In un secondo momento, con l'introduzione della supplementazione enzimatica, questa problematica si è vista ridursi, ma si è notato che le esacerbazioni polmonari, causate principalmente da *Staphylococcus Aureus* e da *Pseudomonas Aeruginosa* erano causa di mortalità. Con l'introduzione degli antibiotici inalatori e sistemici e dei farmaci mucolitici ad uso pressoché cronico si è riusciti ad avere un aumento sostanziale della aspettanza di vita degli affetti. Secondo il report annuale della CF Foundation americana la sopravvivenza mediana degli affetti nel 2019 era di 48,8 e questo valore era più di quanto fosse atteso secondo i pronostici in cui si sarebbe dovuto attestare attorno ai 46,2 anni tra il 2015 e il 2019¹⁰⁹. Si è osservato quindi un trend positivo, con una riduzione del numero di morti a cui si presume abbiano contribuito l'aumento del numero dei trapianti d'organo, un aumento del numero di persone nel Registro con più di 60 anni, e l'introduzione della terapia a base di modulatori di CFTR. Questo trend con l'avvento della pandemia globale da Sars-Cov2, non ha mantenuto questo valore positivo, ma al contrario si osserverà un brusco arresto^{109,117}.

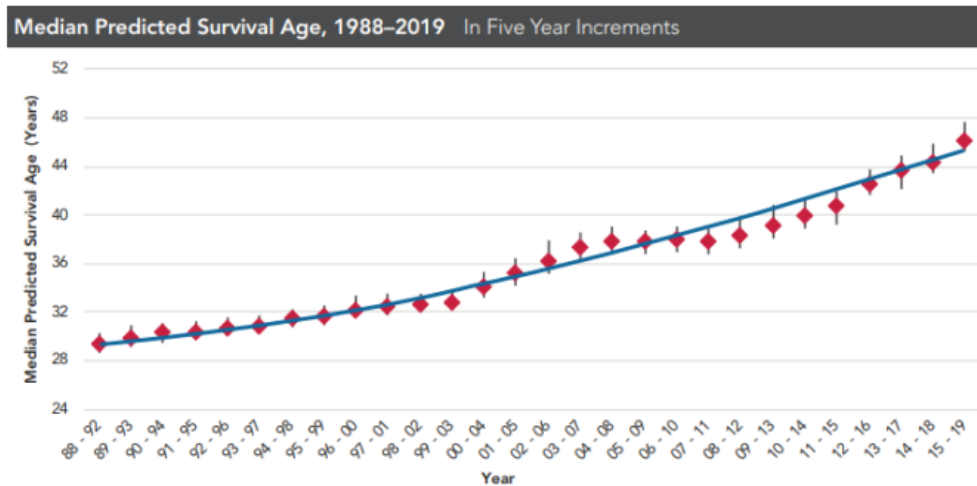


Figura 13 – Sopravvivenza mediana degli affetti da FC tra il 1988 e il 2019¹⁰⁹

In base agli attuali studi si stima che il 50% circa dei pazienti affetti da FC nati tra il 2015 e il 2019 possano sopravvivere oltre i 45 anni, ma questo dato si può giudicare sottostimato in quanto non tiene conto del progresso delle terapie e dell'utilizzo importante dei modulatori di CFTR che si sta avendo nell'ultimo decennio.

Con l'aumento della speranza di vita si è assistito, di riflesso, all'aumento di soggetti adulti affetti dalla patologia a fronte di una relativa stabilizzazione del numero di nuovi nati seppur in parte condizionato dall'analisi prenatale che viene sempre più proposta. Nel 1989 i pazienti affetti con più di 18 anni erano il 31.1%, mentre nel 2019 il dato registrato era del 56%¹⁰⁹.

Si possono identificare diversi fattori che hanno contribuito al miglioramento delle statistiche della sopravvivenza dei soggetti affetti, a partire dalla diagnosi prenatale e neonatale, dalle cure specialistiche catalizzate in centri multidisciplinari qualificati e dallo studio che ha portato alla formazione di un contesto familiare che ne faciliti la gestione anche nel lungo termine. Inoltre, l'identificazione mediante la genomica e la trascrittomiche delle varianti di tipo lieve-moderato un tempo non identificate come diagnosi certa di Fibrosi Cistica, ha contribuito all'aumento dell'età media della popolazione comportando in secondo luogo ad un miglioramento delle statistiche^{11, 90, 109}.

La funzionalità polmonare viene valutata attraverso il FEV₁ rispetto ad un valore predetto, ed è indicativa dello stato di salute del paziente affetto da FC. Negli anni, come si può vedere nella Figura 14 sottostante, i pazienti hanno visto migliorare questo parametro, e parallelamente un miglioramento della qualità di vita, che è in continua evoluzione positiva. Attualmente la maggior parte dei pazienti di 18 anni, ovvero il 78,3%, hanno una FEV₁>70%, mentre nel 1989 questi erano solo il 33,8%. Si sono visti drasticamente diminuire coloro che avevano una FEV₁<40% del valore predetto, quindi una compromissione grave, dal 24% nel 1989, al 2,6% nel 2019.

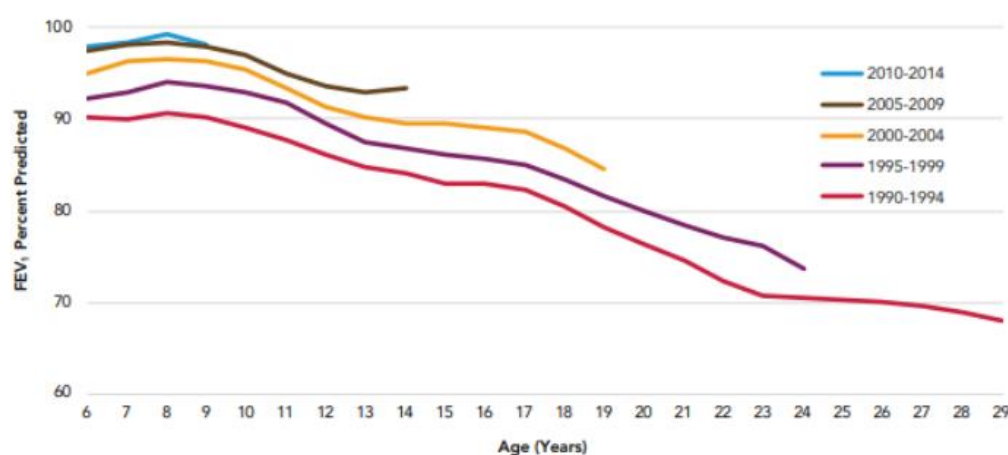


Figura 14 – Percentuale media di FEV₁ rispetto al valore predetto per età e coorte tra il 1990 e il 2014¹⁰⁹

È stato osservato che i pazienti aventi un elevato valore di FEV₁ di partenza mostravano un'aumentata rapidità di declino rispetto a coloro che partivano da valori di FEV₁ più bassi. Questo fenomeno probabilmente è da imputare agli schemi terapeutici poco aggressivi che vengono adottati per i pazienti con malattia polmonare lieve¹²¹.

La valutazione del FEV₁ resta quindi un importante fattore predittivo di mortalità, ma, accanto a questo vanno riconosciuti molti altri fattori prognostici:

- La sopravvivenza è statisticamente differente tra i due sessi, infatti le donne hanno una prognosi fino a 5 anni peggiore rispetto agli uomini. La

ragione di questo divario non è stata ben chiarita, ma si è visto che il sesso femminile viene più precocemente colonizzato e delinea un decorso clinico peggiore, inoltre si è ipotizzato un ruolo rilevante svolto da parte degli estrogeni. Il 17 β -estradiolo (E₂) potrebbe infatti avere un ruolo nell'ulteriore disidratazione delle superfici mucose delle vie aeree già compromesse dalla patologia, ma si è potuta anche sottolineare una relazione tra i picchi ormonali di E₂ e i cicli mestruali con un aumentato rischio di esacerbazioni polmonari.

- La colonizzazione microbica delle vie respiratorie è un fattore prognostico negativo, per la genesi dell'infiammazione acuta, subacuta e cronica. In particolare, l'infezione cronica da *Burkholderia Cepacia Complex (BCC)*, un complesso di 17 batteri Gram negativi tra cui *B. cenocepacia* e *B. multivorans*, correla con una prognosi più infausta¹²¹.
- La mutazione più comune nella popolazione caucasica, F508del, che ricorre nel 70% degli affetti, facendo parte della classe II, si associa ad un fenotipo di malattia severo, e ad una prognosi peggiore come anche le alterazioni delle classi I e III. Al contrario, mutazioni delle classi IV, V e VI mantenendo una funzionalità residua si presentano con un fenotipo più lieve, ed una aspettativa e qualità di vita potenzialmente migliore.
- La modalità di presentazione della malattia ha un ruolo nella prognosi, in particolare tra soggetti colonizzati da *P. Aeruginosa* che si è visto avere un rischio maggiore di pneumopatia severa, e allo stesso tempo, coloro che ricevono la diagnosi non per mezzo dello screening neonatale (NBS), ma per identificazione di ileo da meconio sembrano avere un decorso più severo¹²⁰.
- Il diabete correlato alla FC, soprattutto tra le pazienti donne a cui si associa anche un'implicazione di tipo ormonale importante, unito alla resistenza periferica all'insulina, si accentua durante le esacerbazioni polmonari. L'elevata glicemia permette un aumento dei livelli di glucosio sulla superficie della mucosa polmonare, che a sua volta favorisce la crescita batterica e che aumenta il tasso di esacerbazioni polmonari. Inoltre, a livello renale, peggiora il danno glomerulare già compromesso dall'assunzione cronica di farmaci, dando microalbuminuria.

- L'insufficienza pancreatica esocrina è una complicanza che può palesarsi precocemente, presente nell'85% degli affetti. È stato dimostrato che i soggetti che la manifestano hanno il doppio della probabilità di avere una malattia polmonare grave con $FEV_1 < 40\%$ del valore predetto rispetto a coloro che mantengono una funzionalità pancreatica residua.
- La patologia epatica è presente nel 30% degli affetti e comporta un progressivo sviluppo di steatosi, stasi biliare, ascite e ipertensione portale, che aumentano la probabilità di evolvere verso lo scompenso, a cui ovviamente si associa un rischio più elevato di mortalità rispetto a coloro che non hanno questa manifestazione.
- Lo stato nutrizionale e il peso corporeo vengono costantemente monitorati per mezzo del BMI, in quanto se particolarmente basso correla con un peggioramento della funzionalità respiratoria ed è anche predittivo di un *outcome* meno positivo nell'arco di quattro anni. L'associazione tra malnutrizione, disfunzione esocrina ed endocrina devono essere continuamente controllate perché in una situazione di aumentata richiesta metabolica, come avviene durante le esacerbazioni, il quadro potrebbe aggravarsi.

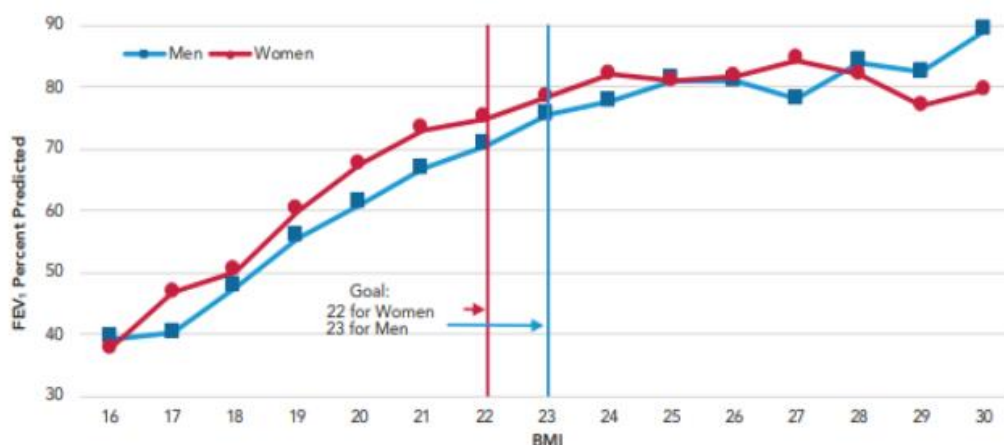


Figura 15 – Correlazione tra $FEV_1\%$ e BMI in pazienti tra i 20 e i 40 anni nel 2019₁₀₉

- Altri fattori prognostici negativi vengono riconosciuti in un basso livello socioeconomico, in un basso reddito, nelle abitudini al fumo di sigaretta e nelle famiglie molto numerose.

- Sono state osservate anche differenze in base all'etnia, in particolare, in quella ispanica si riconosce una prognosi peggiore rispetto a quella caucasica¹¹⁶.
- L'attenzione nel designare dei centri di cura specializzati, che permettano quindi la presa in carico multidisciplinare ed il follow-up del paziente nel lungo periodo, correlano infine con un incremento del BMI medio e conseguentemente con un maggiore FEV₁ comportando infine anche un miglioramento del quadro radiologico.

I dati americani del CF Foundation continuano ad evidenziare un tasso annuale di mortalità (*Mortality Rate*) in continua discesa, infatti attualmente l'età mediana dei pazienti iscritti nel registro è di 20,3, mentre nel 1989 era di 12,0. L'età mediana di morte, invece, nel 2019 era di 32,4 anni mentre nel 2018 era di 30,8 e il valore aumenta notevolmente ogni anno¹⁰⁹.

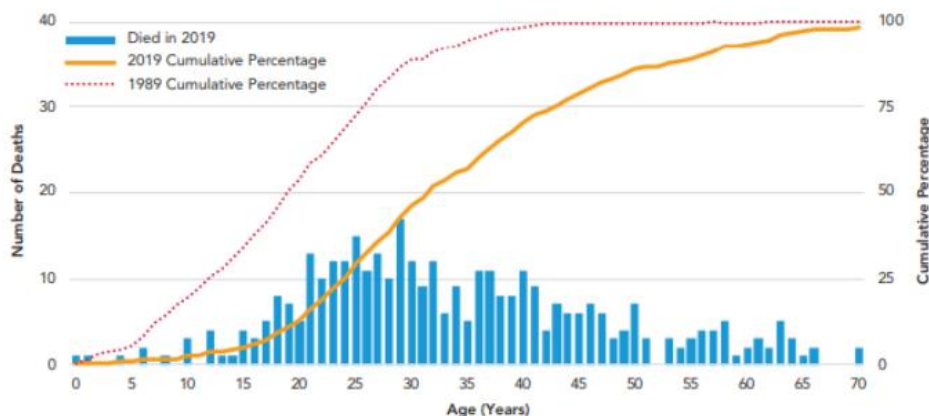


Figura 16 – Curva cumulativa di confronto tra il 1989 e il 2019 dell'età di morte dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica¹⁰⁹

Le cause di decesso in Italia nel biennio 2015-2016 sono state:

1. Insufficienza respiratoria, 56,9%
2. Complicanze post-trapianto, 23,5%
3. Comorbidità e complicanze non inerenti direttamente la FC, 15,7%
4. Insufficienza epatica, 2%¹⁵.

La Fibrosi Cistica, quindi, un tempo considerata una patologia prettamente pediatrica a prognosi severa, oggi è considerabile una malattia anche dell'adulto. La presa in carico globale del soggetto e la cura multidisciplinare della malattia, nonché la diagnosi precoce e le nuove terapie palliative, la supplementazione enzimatica, la possibilità talvolta di eradicare patogeni come lo *Pseudomonas Aeruginosa*, o il trapianto polmonare, hanno permesso di migliorare la sopravvivenza degli affetti. Con la recente introduzione di nuovi farmaci, quali i modulatori, ci si auspica di aumentare l'aspettativa e la qualità di vita ulteriormente¹¹⁶.

1.2 Aspergillosi Broncopolmonare Allergica e *A. fumigatus*

L'associazione tra Aspergillosi Broncopolmonare Allergica (ABPA) e la Fibrosi Cistica è stata sospettata per la prima volta nel 1965, successivamente è stata stimata una prevalenza dell'ABPA tra i pazienti con Fibrosi Cistica dell'8,9%, tuttavia questa stima non è considerata precisa in quanto le manifestazioni cliniche della Fibrosi Cistica stessa coincidono in larga misura con quelle della ABPA e risulta perciò difficile anche solo sospettare l'insorgenza di questa complicanza. Tuttavia una diagnosi e trattamento precoce già a partire dalla sola infezione da *Aspergillus fumigatus* potrebbero rappresentare una tappa fondamentale nell'impedire la progressione della malattia.

I pazienti con Fibrosi Cistica sono spesso colonizzati da *A. fumigatus* e possono successivamente sviluppare una sensibilizzazione allergica verso gli antigeni del fungo, fenomeno che a sua volta precede l'Aspergillosi Broncopolmonare Allergica conclamata. Il quadro clinico può essere molto vario e il paziente può presentare alterazioni laboratoristiche o sintomi isolati prima di manifestare una chiara forma di ABPA¹⁴⁸.

Prima di proseguire con l'approfondimento della Aspergillosi Broncopolmonare Allergica è utile rivedere le caratteristiche biologiche dell'*A. fumigatus* stesso.

Le specie di *Aspergillus fumigatus* sono comuni in tutto il mondo e i loro conidi sono ubiquitari nell'aria, nel terreno e nel materiale in decomposizione. In ambiente ospedaliero le specie di *Aspergillus* si possono trovare nei rubinetti, nei serbatoi idrici e nelle piante in vaso, perciò i conidi sono costantemente inalati. Il tipo di reazione dell'ospite, i reperti patologici associati e l'esito finale dell'infezione dipendono più dai fattori dell'ospite che dalla virulenza o dalla patogenesi di ogni singola specie di *Aspergillus*¹⁴⁹.

A. fumigatus è un ascomicete appartenente alla suddivisione Deuteromycotina all'interno del regno fungino. Anche se *A. fumigatus* è considerata la specie allergenica più comune del genere *Aspergillus*, altre specie hanno un'importante rilevanza medica ad esempio *A. clavatus* è stato implicato nella produzione di risposte allergeniche e potenzialmente ABPA.

Inoltre, per l'*Aspergillus terreus* e l'*Aspergillus flavus* è stata segnalata una resistenza all'Amfotericina B, e questo può avere importanti implicazioni terapeutiche per i pazienti.

Aspergillus fumigatus cresce generalmente con facilità su terreni batteriologici e micologici di routine ed è in grado di crescere a temperature $\geq 50^{\circ}\text{C}$. La capacità di crescere rapidamente anche a 37°C è un'importante caratteristica patogena in quanto permette la rapida progressione della malattia anche nella forma invasiva (eventualità che interessa in modo particolare pazienti sottoposti a trapianto bipolmonare)¹⁵⁰.

1.2.1 Definizioni

Le manifestazioni correlate all'Aspergillo in pazienti con Fibrosi Cistica variano da colonizzazione asintomatica all'Aspergillosi invasiva, più caratteristica di pazienti trapiantati e dunque sottoposti a terapia immunosoppressiva.

A questo proposito Baxter et al. hanno proposto una classificazione basata non solo sulle colture dell'escreato bronchiale ma anche su RT-PCR per *A. fumigatus*, sui livelli di galattomannano nell'escreato, sulle IgE totali e sulle IgE e IgG specifiche per *A. fumigatus*.

Secondo questa classificazione i pazienti con FC possono essere suddivisi in 4 classi rispetto alle manifestazioni correlate all'Aspergillo¹⁵¹.

Classe 1: Non disease patients

Questa categoria comprende sia pazienti in cui l'esame colturale dell'escreato risultata negativo per la ricerca di *A. fumigatus*, sia pazienti in cui risulti positivo ma nei quali la ricerca del galattomannano nell'escreato risulti negativa e nei quali non ci sia evidenza di una risposta immunologica alla presenza di *A. fumigatus*. Va sottolineato tuttavia come non esista una definizione univoca per identificare la colonizzazione da *A. fumigatus* nei pazienti con Fibrosi Cistica.

Una definizione più comune di colonizzazione delle vie aeree da parte dell'Aspergillo consiste nell'identificazione di due o più escreti positivi in un anno in pazienti senza nuovi sintomi respiratori e senza IgG specifiche nel siero¹⁵².

Classe 2: ABPA-Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis

L'Aspergillosi Broncopolmonare Allergica consiste in una complessa reazione da ipersensibilità che si verifica quasi esclusivamente in pazienti affetti da Fibrosi Cistica o asma.

La presentazione clinica dell'ABPA è eterogenea e varia da sintomi acuti quali dispnea, dolore toracico e tosse produttiva con escreato brunastro, a forme molto più sfumate in cui è individuabile solo una riduzione del volume di espirazione forzata in un secondo (FEV1).

Talvolta possono coesistere anche sintomi aspecifici quali febbre e mialgia.

All'imaging radiografico in genere sono individuabili infiltrati parenchimali che scompaiono dopo pochi giorni dall'inizio della terapia steroidea.

Il trattamento dell'ABPA mira ad attenuare la risposta immunitaria attraverso l'uso di terapia steroidea, e spesso affianca anche una terapia con farmaci antifungini (azoli) col fine di contenere il carico antigenico e ridurre l'esposizione alla terapia steroidea¹⁵¹.

Classe 3: Sensibilizzazione

La sensibilizzazione agli antigeni dell'Aspergillo (AS) è frequente e definita dalla presenza di una positività allo skin prick test o da un aumento dei livelli di IgE specifiche per *A. fumigatus* nel siero con solo un lieve aumento delle IgE totali¹⁵³.

La definizione di sensibilizzazione è completamente indipendente dalla presenza di una positività all'esame colturale o all'RT-PCR per *A. fumigatus*.

La sensibilizzazione è considerata una fase pre-ABPA in quanto riflette una predisposizione a sviluppare una reazione immunologica anche in assenza di antigeni pertinenti.

La sensibilizzazione è stata associata a un declino della funzione polmonare e ad un aumento della frequenza delle esacerbazioni, tuttavia non c'è un consenso definitivo riguardo la necessità di avviare il trattamento farmacologico in questi pazienti.

Classe 4: Bronchite Aspergillare

Nei pazienti con Fibrosi Cistica il progressivo danno polmonare correlato alla malattia può favorire lo sviluppo di un'infezione cronica da Aspergillo definita "Bronchite aspergillare".

La Bronchite da *Aspergillus* ha una prevalenza stimata del 2-8% in pazienti con Fibrosi Cistica e può essere sospettata in presenza di un'esacerbazione respiratoria non responsiva al trattamento antibiotico.

Secondo Baxter et al. La diagnosi di Bronchite aspergillare può essere posta in presenza di un'escreato positivo al galattomannano, alti livelli di IgG specifiche per *Aspergillus* e livelli nella norma di IgE totali e specifiche per Aspergillo.

La Bronchite aspergillare riflette l'infezione e non una risposta immunomediata come nell'ABPA perciò la terapia steroidea non è appropriata mentre la terapia con antifungini (azoli) è considerata attualmente la terapia standard¹⁵¹.

Aspergillosi invasiva

L'aspergillosi invasiva si osserva qualora l'infezione progredisca attraverso i tessuti e raggiunga il circolo sanguigno.

In genere l'aspergillosi invasiva si osserva in pazienti gravemente immunodepressi, come alcuni pazienti ematologici oppure pazienti che assumono terapia steroidea ad alte dosi o altri agenti immunosoppressori. Questi pazienti comunemente riportano sintomi quali febbre, dolore toracico, dispnea, e tosse.

L'aspergillosi invasiva è un'evenienza rara nei pazienti con Fibrosi Cistica, tuttavia può verificarsi in pazienti end-stage nelle unità di terapia intensiva o nei primi 3 mesi post-trapianto ed è associata ad un'alta mortalità (39%).

L'aspergillosi invasiva è di norma trattata con terapia antifungina sistemica (azoli)¹⁵⁴.

1.2.2 Epidemiologia

L'*Aspergillus fumigatus* è il fungo isolato più comunemente nei pazienti con Fibrosi Cistica: l'escreato è risultato positivo nel 16% dei bambini e adolescenti e fino al 58% qualora venissero considerati pazienti adulti.

L'uso di protocolli diagnostici specifici per i funghi che consistono in terreni di coltura selettivi per questi e metodi molecolari hanno aumentato la capacità di rilevare l'Aspergillo negli ultimi anni.

Tuttavia un esame colturale dell'escreato positivo non implica necessariamente che il paziente svilupperà ABPA a causa della eterogeneità di interazioni tra il fungo e l'ospite¹⁵²

La prevalenza della sensibilizzazione agli antigeni aspergillari in pazienti con Fibrosi Cistica varia dal 20% al 65% con una prevalenza complessiva del 39,1% (95% IC: 33,3-45,1) senza differenze statisticamente significative tra adulti e bambini. La prevalenza della sensibilizzazione all'Aspergillo tuttavia è maggiore quando per la diagnosi vengono usati gli skin prick test rispetto alla prevalenza calcolata a partire da diagnosi basate sulla rilevazione delle IgE specifiche per *A. fumigatus* (42.8% vs. 32.8%, $p = 0.0002$).

La prevalenza di ABPA in pazienti con FC varia dal 3% al 25% con una prevalenza complessiva dell'8,9% (95% IC:7,4-10,7).

La prevalenza di ABPA risulta significativamente maggiore negli adulti rispetto ai bambini (10,1% vs 8,9% $p < 0,0001$).

La prevalenza di AS invece è simile tra adulti e bambini, questo intuitivamente suggerisce che la sensibilizzazione sia un evento che si verifica precocemente nel corso della malattia, mentre che lo sviluppo di ABPA sia un evento più tardivo nella storia clinica¹⁵³.

Infine è importante sempre considerare che la prevalenza di ABPA varia in base alla fascia d'età della popolazione presa in esame (bambini/adulti), all'area geografica considerata e ai criteri diagnostici scelti.

1.2.3 Patogenesi

È ormai riconosciuto che l'ABPA sia causata da una reazione di ipersensibilità agli antigeni dell'*Aspergillus fumigatus*, ma il motivo per cui solo alcuni pazienti sviluppino la reazione allergica, e dunque la malattia, rimane incerto e oggetto di studio.

Le spore dell'*A. fumigatus* hanno dimensioni molto ridotte (3-5 μm), che permettono loro di raggiungere in profondità le vie aeree dove causano un danno alla clearance mucociliare e alla barriera epiteliale e attivano una forte reazione immunitaria di tipo 2. La risposta immunitaria di Tipo 2 è caratterizzata dalla produzione di IL-4, IL-5 e IL-13 da parte di cellule linfoidi innate, cellule Th2 ed

eosinofili, dalla degranulazione dei mastociti e dall'attivazione degli eosinofili con un aumento delle IgE totali e, delle IgE specifiche per l'*Aspergillo* e una produzione di anticorpi IgG specifici per l'*Aspergillo*.

La conseguente infiammazione eosinofila determina infiltrati polmonari ricorrenti e infine bronchiectasie e fibrosi polmonare.

Le spore dell'*A. fumigatus* presentano inoltre uno spesso strato esterno proteico idrofobico che permette loro di eludere la fagocitosi dei macrofagi che rappresenta la prima linea di difesa immunitaria.

I neutrofili e i monociti fungono da seconda linea di difesa per l'organismo, che attraverso meccanismi sia dipendenti che indipendenti dalle osponine eliminano le ife fungine, che si formano dalla germinazione delle spore negli alveoli.

Tuttavia *A. fumigatus* è in grado di eludere il sistema immunitario mediante numerosi fattori di virulenza quali: superossido dismutasi, catalasi, mannitolo, proteasi, ribotossina, acido fitico, fosfolipasi e gliotossina ed emolisina. Questi fattori hanno un ruolo determinante nella patogenesi dell'aspergillosi invasiva, tuttavia molte di queste proteine hanno anche un potenziale antigenico elevato e rappresentano il bersaglio principale della risposta immunitaria nei pazienti con ABPA.

Nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica inoltre, vi è una ridotta componente protettiva data dalla risposta immunitaria innata in quanto la disfunzione della proteina CFTR comporta una clearance mucociliare deficitaria: le spore di *Aspergillo*, che penetrano nelle vie aeree dei pazienti, aderiscono al collagene e alle fibre di fibronectina nella lamina basale e ciò facilita la persistenza del fungo nelle vie aeree distali.

Le proteinasi allergeniche secrete da *Aspergillus* sono considerate il principale fattore patogeno che facilita la persistenza del fungo nelle vie respiratorie. Queste sono riconosciute dai recettori TLR 2, TLR4 e TLR6 della risposta immunitaria innata, e scatenano l'infiammazione allergica delle vie aeree mediante l'attivazione dell'immunità innata e adattativa e il rilascio di citochine pro-infiammatorie.

Sebbene gli eosinofili siano stati tradizionalmente considerati centrali nella lotta contro le infezioni fungine, le più recenti evidenze attribuiscono alle citochine della risposta immunitaria di tipo 2 un ruolo importante nella reazione di ipersensibilità all'*A. fumigatus*. Studi al citometro a flusso su sangue periferico di

pazienti affetti da Fibrosi Cistica con ABPA hanno mostrato un orientamento verso le cellule Th2 con una riduzione della produzione di IFN γ e modelli murini hanno confermato che la mutazione CFTR è associata a una maggiore sensibilità all'IL-4.

L'IL-4/IL-13 derivate dalle cellule T sono essenziali per l'eosinofilia e l'infiammazione polmonare indotta da *A. fumigatus*, mentre gli eosinofili sembrano avere una funzione immunomodulante e non solo pro-infiammatoria.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la maggiore suscettibilità dei pazienti con Fibrosi Cistica all'ABPA potrebbe essere dovuta a una risposta Th2 esagerata e ad una risposta Th1 carente.

Tuttavia, una chiara comprensione dei meccanismi fisiopatologici che determinano le forme allergiche e croniche dell'aspergillosi polmonare, come l'ABPA, è stata limitata dalla mancanza di modelli murini affidabili di colonizzazione da *Aspergillus*, prerequisito fondamentale per lo sviluppo della malattia.

Nonostante ciò è stato possibile individuare alcuni fattori che aumentano il rischio di colonizzazione da *Aspergillo* e delle patologie correlate.

Uno studio multicentrico basato su 1541 soggetti affetti da FC (età media 15 anni) che hanno sviluppato colonizzazione da *A. fumigatus* dimostra che l'insufficienza pancreatica era il più grande fattore di rischio per l'infezione da *A. fumigatus*, seguita dall'uso di macrolidi, antibiotici inalatori e steroidi¹⁵⁵.

In uno studio condotto su 26 bambini invece un indice di massa corporea basso (BMI) aumentava di 10 volte il rischio di ABPA¹⁵⁶.

Tuttavia questi risultati non sono conclusivi in quanto l'*Aspergillo* potrebbe essere più frequente in pazienti con una malattia più severa e che perciò richiedono terapia antibiotica a lungo termine.

È stato sostenuto inoltre, che terapie antibiotiche aggressive come l'azitromicina a lungo termine e gli antibiotici cronici per via inalatoria in età precoce possano aver diminuito la prevalenza di *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, ma aumentato la colonizzazione delle vie aeree da parte di *Aspergillus*.

Il meccanismo alla base dell'associazione tra la terapia a lungo termine con macrolidi e il rischio di colonizzazione da *Aspergillus* sarebbe l'effetto inibitorio dell'azitromicina sul reclutamento e l'attivazione dei neutrofili, la seconda linea di difesa contro l'*Aspergillus*.

Per quanto riguarda i fattori genetici predisponenti, HLA DR2 e DR5, e possibilmente DR4 e DR7, sono stati suggeriti aumentare il rischio di ABPA, mentre HLA DQ2 sembra essere protettivo.

Inoltre è stato individuato uno specifico genotipo nella regione promotore di IL-10 come fattore predisponente per la colonizzazione da *A. fumigatus* e lo sviluppo di ABPA.

Infine l'alterazione del microbioma delle vie aeree potrebbe essere un fattore predisponente la colonizzazione fungina e lo sviluppo di ABPA in pazienti suscettibili e questa alterazione potrebbe essere ancora più marcata nei pazienti con FC a causa proprio del frequente uso di antibiotici.

È evidente dunque che l'interazione tra virulenza dell'*Aspergillus* e suscettibilità dell'ospite sia determinante per quanto riguarda l'insorgenza e il decorso della malattia^{150,152}.

1.2.4 Caratteristiche cliniche

I sintomi dell'Aspergillosi Broncopolmonare Allergica sono spesso aspecifici e ricalcano le caratteristiche cliniche della Fibrosi Cistica stessa. Fino a un terzo dei pazienti con FC sono asintomatici e la diagnosi di ABPA viene posta ai controlli di routine.

I sintomi più comuni sono la tosse cronica produttiva e wheezing, meno di frequente i pazienti possono presentare dolore toracico pleurico e emoftoe. I tappi di muco scuro sono dovuti a un'aumentata produzione di muco denso nel tratto respiratorio e consistono di cellule infiammatorie, compresi gli eosinofili, cellule epiteliali desquamate e mucine.

L'emottisi può verificarsi in caso di infiammazione severa e bronchiectasie.

Sintomi più generali quali febbre, mialgia, calo ponderale sono riscontrabili nel 26% dei pazienti con FC e ABPA.

L'esame obiettivo di solito è caratterizzato da crepitii, ronchi che non rispondono al trattamento con broncodilatatori, assenza di suoni respiratori distali ai tappi mucosi, e la presenza di clubbing digitale.

Tutti questi segni comunque non sono specifici di ABPA ma sono reperti molto comuni della patologia di base.

Nella malattia in fase terminale, possono essere presenti reperti di cuore polmonare.

L'ABPA deve essere sempre sospettata in un paziente con FC che sviluppa respiro sibilante o riduzioni importanti del volume di espirazione forzata in un secondo (FEV1) senza evidenza di un'esacerbazione della malattia di base, che non risponde ad antibiotici appropriati, alla fisioterapia standard e i cui sintomi non possono essere spiegati da un'altra eziologia.

Stadi

In base alle caratteristiche cliniche e laboratoristiche si possono individuare 5 stadi di malattia (come illustrato nella **Tabella I**):

Stadio 1 fase acuta: sono presenti le caratteristiche tipiche della patologia (IgE specifiche per *A. fumigatus*, IgG specifiche per *A. fumigatus*, caratteristiche radiologiche tipiche, eosinofilia periferica)

Stadio 2 fase di remissione: il paziente è asintomatico, non ci sono nuovi infiltrati alle immagini radiologiche, non c'è stato aumento delle IgE totali per almeno 6 mesi, o se l'aumento si è verificato si è mantenuto <50%, in assenza di terapia antifungina o steroidea.

Stadio 3 esacerbazione: appaiono nuovi infiltrati polmonari con eosinofilia e raddoppio dei livelli di IgE rispetto alla fase di remissione, il paziente presenta un deterioramento delle condizioni cliniche e un aumento della tosse produttiva con necessità di terapia antibiotica.

Stadio 4 malattia steroideo-dipendente: il paziente riceve alte dosi di terapia steroidea sistemica a lungo termine e qualora si tenti di scalare e eventualmente sospendere la terapia il paziente recidiva.

Stadio 5 fibrosi polmonare: radiografie del torace o immagini TAC mostrano fibrosi irreversibile e bronchiectasie diffuse¹⁵⁷.

	Definition	Total IgE	Precipitins	Eosinophilia	IgE- A. fumigatus	IgG- A. fumigatus	Lung infiltrates
Stage 1 (acute stage)	The patient has all the clinical and radiologic features of ABPA, responds well to oral corticosteroid therapy, and corticosteroids can be discontinued. Patient is considered in remission if improvement continues for six months	+++	+	+	+	+	+
Stage 2 (remission)	At this stage, clinical and radiologic improvement is achieved. Total IgE is at least 25% decreased. Some patients may enter remission spontaneously. Stage 2 can persist indefinitely or the disease may recur	+	±	-	±	±	-
Stage 3 (relapse)	It has all the features of stage 1. If a patient is on routine follow-up, at least a doubling in serum IgE level with new infiltrations on chest radiography is seen	+++	+	+	+	+	+
Stage 4 (steroid-dependent stage)	The patient receives long-term high-dose systemic steroid therapy. When the steroid dose is tried to be reduced and stopped, it relapses	++	±	±	±	±	-
Stage 5 (end-stage lung disease)	Diffuse bronchiectasis, fibrosis, cor pulmonale has developed. Serum total IgE level can be normal or elevated	+	±	-	±	±	-

ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; A. fumigatus, *Aspergillus fumigatus*, IgE, immunoglobulin E, IgG, immunoglobulin G.

Tabella I- Caratteristiche cliniche e sierologiche degli stadi di ABPA₁₅₇

Al momento della diagnosi i pazienti possono essere individuati in qualsiasi stadio e il passaggio da uno stadio a un altro non avviene necessariamente in ordine.

È importante inoltre considerare che la sierologia per ABPA darà esito più probabilmente positivo negli stadi 1 e 3.

Una diagnosi precoce e un trattamento tempestivo sono fondamentali per evitare la progressione allo stadio 5₁₅₇.

1.2.5 Diagnosi

La diagnosi di ABPA nei pazienti con Fibrosi Cistica è complessa e può essere ritardata perché molti dei sintomi e delle caratteristiche proprie dell'ABPA coincidono con le manifestazioni cliniche della Fibrosi Cistica. Non esiste un singolo test che da solo permetta di porre diagnosi di ABPA in pazienti con Fibrosi Cistica, si giunge alla diagnosi attraverso l'analisi dei reperti clinici, immunologici e radiologici del singolo paziente.

Negli anni sono stati stilati diversi set di criteri diagnostici per la diagnosi di ABPA nei pazienti con FC, che sono stati riassunti nella Tabella II in ordine cronologico.

I due set di criteri diagnostici più usati sono le Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference (CFFCC) recommendations (2003) e i criteri proposti dall'

International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) Working Group (2013).

Le raccomandazioni della CFFCC nel 2003 definiscono quanto segue:

Criteri diagnostici

1. Deterioramento clinico, acuto o subacuto, che non è spiegato da un'altra eziologia.
2. Concentrazione di IgE totali nel siero >1.000 UI/mL (a meno che il paziente non sia trattato con terapia corticosteroidica sistemica).
3. Reattività cutanea immediata all'*Aspergillus* (skin prick test >3 mm di diametro con eritema circostante) o rilevazione in vitro di IgE sieriche specifiche per *A. fumigatus*.
4. Anticorpi precipitanti contro *A. fumigatus* o rilevazione della presenza nel siero di IgG specifiche per *A. fumigatus* tramite un test in vitro;
5. Evidenza di nuovi infiltrati alla radiografia del torace o bronchiettasie alla tomografia computerizzata del torace che non rispondono ad appropriata terapia antibiotica e alla fisioterapia standard.

Criteri diagnostici minimi

1. Deterioramento clinico, acuto o subacuto, che non è spiegato da un'altra eziologia.
2. Concentrazione di IgE totali nel siero >500 UI/mL. Se il livello di IgE totali è di 200-500 e si sospetta l'ABPA, il test va ripetuto dopo 1-3 mesi.
3. Reattività cutanea immediata all'*Aspergillus* (skin prick test >3 mm di diametro con eritema circostante, mentre il paziente non è in trattamento con antistaminici per via sistemica) o presenza in vitro di anticorpi IgE contro *A. fumigatus*;
4. Uno dei seguenti elementi:
 - (a) precipitine verso *A. fumigatus* o dimostrazione in vitro della presenza di anticorpi IgG contro *A. fumigatus*;
 - (b) anomalie nuove o recenti alla radiografia del torace (infiltrati o plugging mucoso) o bronchiettasie alla TC del torace che non rispondono a terapia antibiotica appropriata e alla fisioterapia standard.

La Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference per quanto riguarda lo screening per ABPA nei pazienti affetti da FC raccomanda:

- Considerare sospetti per ABPA i pazienti di età > 6 anni, in particolare coloro che son soggetti a un più rapido peggioramento clinico.
- Monitoraggio annuale della concentrazione sierica di IgE totali. Se la concentrazione sierica di IgE totali è >500 UI/mL, è necessario confermare il risultato attraverso skin prick test o rilevazione in vitro di IgE specifiche per *A. fumigatus*.

Se i risultati sono positivi, considerare la diagnosi sulla base di criteri minimi.

- Se la concentrazione di IgE totali nel siero è di 200-500 UI/mL, è opportuno ripetere i test dopo 1-3 mesi se permane il sospetto di ABPA^{152,157}.

Nel 2013 lo ISHAM Working Group ha delineato nuovi criteri diagnostici con l'obiettivo di semplificare il processo diagnostico per ABPA. In questo caso prima di accedere ai criteri diagnostici veri e propri è necessario assicurarsi che il paziente presenti una delle due condizioni predisponenti per l'ABPA ovvero: l'asma o la Fibrosi Cistica.

Sono stati individuati dunque:

Criteri obbligatori (entrambi devono essere soddisfatti)

- Aumento della concentrazione di IgE totali >1000IU/mL (ma se il paziente rispetta tutti gli altri criteri un valore di IgE<1000IU/mL può essere accettato soprattutto se i livelli di IgG specifiche per *A. fumigatus* sono >27mg/L)
- Livelli di IgE specifiche per *A. fumigatus* >0.35kU/L o positività allo skin prick test per *Aspergillus*.

Altri criteri (almeno due devono essere soddisfatti)

- Elevati livelli di IgG specifiche per *A. fumigatus* (>27mg/L) o presenza di precipitine nel siero.
- Opacità polmonari alle immagini radiografiche coerenti con il sospetto di ABPA

- Eosinofilia in pazienti non sottoposti a terapia steroidea (eosinofili >500 cell/microL), questo reperto può essere anche storico^{152,157}.

Maleki et al. hanno dimostrato che non vi erano differenze significative sul tasso di prevalenza di ABPA riportato nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica qualora venissero adottati per la diagnosi i criteri diagnostici della Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference (CFFCC) o della International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM)¹⁵⁸.

Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis recommendations, 1999

Two of the following 3 criteria are required

- Immediate cutaneous reactivity to *A. fumigatus*
- Precipitating antibodies to *A. fumigatus*
- Serum total IgE of >1,000 IU/mL

In addition, at least 2 of the following are required

- Bronchoconstriction
 - Peripheral blood eosinophil count >1,000/mL
 - History of pulmonary infiltrates
 - Elevated serum anti-*A. fumigatus* IgE or IgG
 - *A. fumigatus* in sputum found by smear or culture
 - Response to steroids treatment
-

The UK Cystic Fibrosis Trust recommendations, 2002

- Asthma symptoms
 - New chest radiography changes
 - Serum total IgE >500 IU/mL or four-fold increase in IgE titers
 - Raised specific IgE aspergillus RAST or positive skin prick test to *A. fumigatus*
 - Blood eosinophil count >500/mm³
 - Positive Aspergillus culture in sputum or fungal hyphae
-

Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference recommendations, 2003

Classic case

- Acute or subacute clinical deterioration that is not attributable to another etiology
- A serum total IgE level of >1,000 IU/mL (unless patient is receiving systemic steroids)
- Presence of IgE antibodies to *A. fumigatus* *in vitro* or immediate cutaneous hypersensitivity to Aspergillus (skin test >3 mm)
- Precipitating antibodies to *A. fumigatus* or serum IgG antibody to *A. fumigatus* by an *in vitro* test
- New or recent abnormalities on chest radiography or computed tomography that do not respond to antibiotics and standard physiotherapy

Minimal diagnostic criteria

- Acute or subacute clinical deterioration that is not attributable to another etiology
- A serum total IgE level of >500 IU/mL (unless patient is receiving systemic steroids)
- Immediate cutaneous hypersensitivity to Aspergillus (skin test >3 mm) or presence of IgE antibodies to *A. Fumigatus*

Plus one of the following

- Precipitins to *A. fumigatus* or IgG antibody to *A. fumigatus* *in vitro*
 - New or recent infiltrates (or mucus plugging) on chest radiography or computed tomography that do not respond to antibiotics and standard physiotherapy
-

American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Committee Report, 2012

Minimum essential criteria

- Asthma or cystic fibrosis
- Immediate cutaneous reactivity on skin-prick testing
- Elevated serum total IgE level (>1,000 ng/mL)

Plus one or both of the following

- Elevated serum IgE and IgG levels to *A. fumigatus* (at least twice asthma controls)
 - Proximal (central) bronchiectasis on radiography (inner two-thirds of lung on computed tomography)
-

International Society for Human and Animal Mycology Working Group, 2013

Predisposing conditions

Asthma or cystic fibrosis

Obligatory criteria (both must be present)

- Aspergillus skin test positivity or elevated IgE levels against *A. fumigatus*
- Elevated total IgE concentration (typically >1,000 IU/mL)

Other criteria (at least 2 must be present)

- Precipitating serum antibodies to *A. fumigatus* or elevated serum Aspergillus IgG by immunoassay
 - Radiographic pulmonary opacities consistent with ABPA
 - Total eosinophil count of >500 cells/mL in patients who are steroid naive (may be historical)
-

Tab II-Storico dei criteri diagnostici accettati per la diagnosi di ABPA₁₅₇.

1.2.6 Terapia

Il trattamento tempestivo dell'ABPA ha l'obiettivo di controllare la sintomatologia, prevenire e trattare le esacerbazioni, ridurre l'infiammazione polmonare e la progressione a malattia polmonare terminale. Le conseguenze attese di un trattamento tardivo comprendono: lo sviluppo di fibrosi polmonare, bronchiectasie e riduzione della funzione polmonare.

La terapia di base comprende farmaci steroidei per il controllo del processo infiammatorio e azoli per ridurre la carica fungina con l'obiettivo di attenuare l'iperreattività del sistema immunitario, più di recente sono stati proposti per la terapia dell'ABPA anche anticorpi monoclonali.

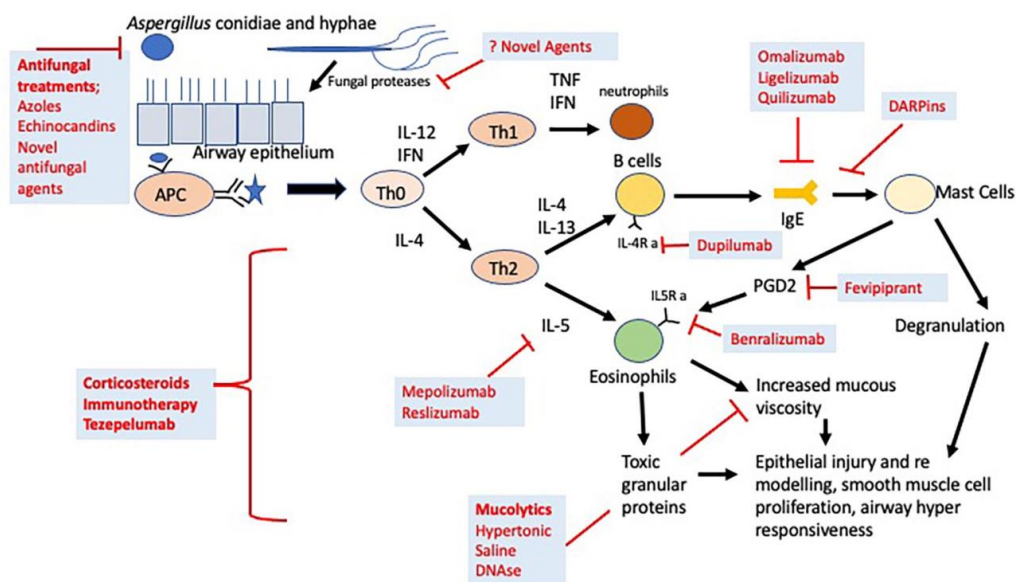


Figura 17- Sintesi dell'azione dei diversi agenti terapeutici nell'ABPA¹⁵⁹.

Corticosteroidi

La terapia sistemica è attualmente il trattamento considerato più efficace nella terapia dell'ABPA. L'uso di corticosteroidi si basa sull'esperienza clinica, trial randomizzati non esistono e verosimilmente non verranno intrapresi per motivi etici. Il prednisolone è il farmaco più comunemente usato, sono dunque stati studiati due regimi di dosaggio per la terapia orale: dose media e dose alta.

Il regime a media dose consisteva nel prednisolone 0,5 mg/kg/die per 1-2 settimane, quindi terapia a giorni alterni per 6-8 settimane per poi diminuire di 5-10 mg ogni 2 settimane fino a cessare la terapia dopo 3-5 mesi.

Il regime ad alto dosaggio consisteva in 0,75 mg/kg/die di prednisolone per 6 settimane, seguito da 0,5 mg/kg/die per 6 settimane.

La dose è stata poi ridotta di 5 mg ogni 6 settimane per raggiungere una durata di trattamento di 6-12 mesi.

Il lavoro di Argarwal del 2016, trial randomizzato controllato su 92 pazienti con asma e ABPA ha riscontrato che il regime a medio dosaggio è risultato altrettanto efficace, ma gravato da meno effetti collaterali, rispetto a quello ad alte dosi nell'ABPA acuta, senza alcuna differenza significativa nel tempo necessario a sviluppare l'esacerbazione successiva o nel rischio di progressione verso l'ABPA steroide-dipendente. Nella coorte trattata con regime ad alto dosaggio inoltre si sono verificati un numero significativamente maggiore di complicanze correlate alla terapia steroidea¹⁶⁰.

La commissione del ISHAM raccomanda di non usare alte dosi di terapia steroidea inalatoria come unico trattamento per ABPA a causa di una mancanza di evidenza di efficacia.

La terapia steroidea endovenosa pulsata (pulse steroid therapy) è ancora in fase di studio, consiste nell'infusione di metilprednisolone ev per tre giorni consecutivi ogni mese e potrebbe rappresentare una alternativa per i pazienti che non rispondono alla dose standard di terapia steroidea orale o che ne sviluppano gli effetti avversi. Nella letteratura disponibile sembra che questo tipo di terapia sia ben tollerato dai pazienti e che sia possibile interromperla dopo 6-12 mesi con controllo della malattia^{157,161}.

I farmaci corticosteroidi sono usati principalmente per il loro effetto antinfiammatorio tuttavia non sono stati svolti né studi di farmacocinetica/farmacodinamica, né studi controllati randomizzati nella popolazione affetta da Fibrosi Cistica sia adulta che pediatrica affetta da ABPA¹⁸⁰.

Antifungini

Sono i farmaci più di frequente combinati agli steroidi nel trattamento dell'ABPA. Sono prescritti di frequente ai pazienti che sviluppano steroide-resistenza o qualora si voglia ridurre la dose o la durata della terapia steroidea.

Lo scopo è ridurre la carica fungina nel tratto respiratorio in modo da limitare lo stimolo antigenico responsabile dell'inflammazione, migliorando così i sintomi e rallentando la progressione di malattia.

Non è possibile abbassare la carica fungina riducendo l'esposizione ad ambienti ad alto rischio (ambienti dove è presente materiale in decomposizione o ambienti interni umidi) in quanto *A. fumigatus* è ubiquitario, l'unica strategia efficace per ottenere questo risultato è dunque la terapia antifungina.

Tra gli Azoli l'Itraconazolo è il farmaco storicamente più usato nella terapia dell'ABPA, tuttavia gli studi riguardo il suo utilizzo in pazienti con FC e ABPA sono datati e si basavano su pochi pazienti. Più di recente due studi controllati randomizzati hanno valutato il ruolo dell'Itraconazolo nell'ABPA ma hanno incluso solo pazienti con asma.

La Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference (CFFCC) raccomanda di mantenere breve la durata della terapia con Itraconazolo in quanto vi è il rischio emergente di specie di *Aspergillus* azoli-resistenti. Inoltre Itraconazolo è sconsigliato nella terapia iniziale di pazienti con FC e ABPA ma dovrebbe essere aggiunto alla terapia solo se è presente una lenta o scarsa risposta alla terapia steroidea, in caso di recidiva di ABPA o di tossicità da corticosteroidi e nei pazienti che sviluppano steroide-dipendenza.

Nei pazienti in trattamento con Itraconazolo è opportuno monitorare la funzionalità epatica e la concentrazione sierica di farmaco soprattutto se assunto in concomitanza ad altri farmaci a causa delle numerose interazioni (Itraconazolo è inibitore di CYP450).

Nuovi azoli (Posaconazolo e Voriconazolo) sono stati introdotti per il trattamento di pazienti che non avevano risposto a terapia con Itraconazolo o che né avevano manifestato gli effetti avversi. Le reazioni avverse più comuni comprendono nausea, dolore addominale e cefalea¹⁵⁹.

Nella popolazione affetta da FC ci sono alcune evidenze che suggeriscono che il Posaconazolo sia più efficace degli altri azoli nel trattamento della ABPA comportando una maggiore riduzione di IgE specifiche per *A. fumigatus*. Gli autori suggeriscono che questo risultato sia dovuto a una migliore biodisponibilità e capacità di raggiungere livelli terapeutici di farmaco¹⁶².

Studi controllati randomizzati sono necessari per analizzare l'efficacia relativa dei nuovi farmaci azoli nella terapia dell'ABPA.

Amfotericina B nebulizzata (NAB)

È una strategia utile a mantenere in remissione pazienti con esacerbazioni ricorrenti, tuttavia ha scarsa efficacia nel trattamento di ABPA in fase acuta o in corso di esacerbazione.

NAB può peggiorare o indurre broncospasmo perciò la prima dose dovrebbe essere somministrata con cautela e broncodilatatori short-acting dovrebbero essere somministrati 15-30 min prima della NAB¹⁶³.

Anticorpi monoclonali

In pazienti refrattari o intolleranti alla terapia steroidea e antifungina è stata proposta una terapia con anticorpi monoclonali.

Omalizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato contro le IgE, raccomandato per il trattamento dell'asma allergico non controllato e dell'orticaria spontanea cronica. È stato proposto per il trattamento di ABPA in quanto il suo meccanismo d'azione si basa sull'antagonismo delle IgE. Nonostante Omalizumab sembri facilitare il controllo dell'ABPA in pazienti asmatici, l'evidenza a supporto dell'uso in pazienti con FC è limitata a dati ottenuti da case report, poiché i livelli di IgE nell'ABPA sono molto elevati in genere sono necessarie alte dosi di farmaco, tuttavia un dosaggio standard non è stato stabilito.

Mepolizumab è stato proposto nel trattamento dell'ABPA qualora le linee di terapia standard non siano risultate efficaci, si tratta di un anticorpo monoclonale anti IL-5 usato nel trattamento dell'asma grave eosinofilo refrattario (l'IL-5 è un mediatore chiave nella differenziazione, attivazione, migrazione degli eosinofili). La maggior parte dei dati a disposizione per quanto riguarda Mepolizumab sono stati raccolti su pazienti asmatici non con FC.

Dupilumab è un anticorpo monoclonale umanizzato anti IL4-R usato nel trattamento della dermatite atopica e dell'asma severa, agisce come doppio inibitore delle vie dell'IL-4 e dell'IL-13 ridimensionando così il signalling Th2. Dupilumab è stato proposto nel trattamento dell'ABPA refrattario alla terapia standard ma l'evidenza proviene solo da case report su pazienti asmatici¹⁵⁷.

Mucoattivi e Mucolitici

A fianco alla terapia steroidea e antifungina trattamenti che riducano la viscosità del muco sono stati usati con l'obiettivo di ridurre la sintomatologia nei pazienti con ABPA.

La soluzione salina ipertonica può essere usata come mucoattivo per ridurre la viscosità dell'escreato e promuovere la clearance, tuttavia non sono stati condotti studi riguardo il beneficio di tale terapia a lungo termine.

Tra i mucolitici è stato proposto l'utilizzo di Dornase-alfa e N-Acetilcisteina tuttavia non è stato realizzato alcun trial che includesse specificamente pazienti con ABPA^{159,164}.

Modulatori

Negli ultimi anni sono emersi dati promettenti sui farmaci modulatori di CFTR poiché sembra riescano a ridurre in modo significativo la positività per *Aspergillus* alle colture dell'escreato¹⁶⁵.

Terapia della ABPA sulla base delle evidenze attuali

E. Lewington-Gower et al in un Review article del 2021 riassumono le terapie idonee al trattamento della Aspergillosi Broncopolmonare Allergica alla luce delle evidenze attuali, sottolineando come sia necessario adattare il piano terapeutico allo stadio di malattia caratterizzante il paziente di volta in volta¹⁵⁹.

Il protocollo suggerito per il trattamento dell'ABPA prevede di iniziare il trattamento steroideo a medio dosaggio nel paziente in Stadio 1 di malattia.

È importante inoltre impostare un programma fisioterapico idoneo e la terapia mucolitica, se necessaria, valutando ogni paziente individualmente.

La risposta al trattamento deve essere monitorata inizialmente a intervalli di 6-8 settimane mediante: la rilevazione dei livelli di IgE nel siero, la radiografia del torace, una valutazione della funzionalità polmonare e la somministrazione di questionari sulla qualità della vita. L'obiettivo della terapia deve essere quello di ridurre il livello di IgE del 25-50% e raggiungere la fase di remissione (stadio 2) e la stabilità clinica.

Gli steroidi possono essere ridotti o scalati fino alla sospensione in fase di remissione (stadio 2). Un'ulteriore esacerbazione (stadio 3) può essere trattata con

la sola terapia steroidea o in combinazione con un antimicotico (Itraconazolo o se non efficace, Posaconazolo o Voriconazolo).

Se il paziente diventa dipendente dal trattamento con corticosteroidi (stadio 4), si possono utilizzare antimicotici alternativi, Metilprednisolone ev, Amfotericina nebulizzata o farmaci biotecnologici monoclonali¹⁶⁶.

La terapia dell'ABPA nei pazienti con Fibrosi Cistica si basa sull'esperienza acquisita con la pratica clinica o su studi condotti su pazienti con ABPA e asma. Gli studi che hanno reclutato pazienti con FC sono un numero molto limitato e nella maggior parte dei casi includevano pazienti adulti, saranno perciò necessari in futuro studi controllati randomizzati per definire la posologia e la durata della terapia più appropriate per i pazienti con FC con una particolare attenzione per la popolazione pediatrica.

Nonostante il potenziale ruolo dei nuovi farmaci biologici e antifungini anche in questo caso vi è una carenza critica di trials controllati randomizzati su vasta scala svolti in pazienti con ABPA. L'evidenza attuale per l'utilizzo dei nuovi farmaci biologici e antifungini si basa su case series o sottogruppi di trials maggiori limitando così le opzioni terapeutiche per i pazienti.

La comprensione dell'eterogeneità della ABPA e dei suoi sottotipi sarà fondamentale per assicurare la stratificazione della terapia e il successo dei futuri trials clinici.

Nonostante vi sia accordo sul fatto che una diagnosi precoce e trattamento tempestivo dei pazienti con FC e ABPA sia fondamentale per prevenire complicazioni quali bronchiectasie, evoluzione della fibrosi polmonare e riduzione della funzionalità respiratoria, sono assenti trials su larga scala che permettano di comprendere il reale impatto sulla prognosi del paziente di questa complicanza scorporandola dall'effetto di altri fattori di rischio per evoluzione alla fase terminale di malattia, che possono coesistere di frequente in questi pazienti^{152,157,159}.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Questo lavoro ha l'obiettivo di identificare nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica afferenti al Centro di Treviso la prevalenza di colonizzazione da *A. fumigatus*, di sensibilizzazione allergica al fungo, di Bronchite aspergillare e di ABPA.

In questa indagine vengono identificati inoltre i pazienti che nel periodo in esame sono stati sottoposti a terapia per ABPA mediante steroidi sistemici e antifungini, e i soggetti in cui la terapia ha avuto successo nell'eradicare *A. fumigatus* o nel risolvere l'Aspergillosi Broncopolmonare Allergica.

Si ha l'obiettivo inoltre di individuare i fattori di rischio per la colonizzazione da *A. fumigatus*, per l'eventuale sviluppo di sensibilizzazione allergica al fungo e successivamente di ABPA e delle sue recidive.

2.1 Obiettivi primari

- Identificare i soggetti afferenti al centro FC di Treviso con colonizzazione da *A. fumigatus* (presenza in 2 o più tamponi faringei/escreati in 12 mesi), con sensibilizzazione agli antigeni del fungo, con Bronchite aspergillare o con ABPA.

2.2 Obiettivi secondari

- Identificare i fattori di rischio per la colonizzazione da parte di *Aspergillus fumigatus*, la sensibilizzazione agli antigeni del fungo, lo sviluppo di Bronchite aspergillare e di ABPA:
 - età, genere, genotipo,
 - colonizzazioni (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *A. xylosoxidans*, *S. maltophila*, *B. cepacea*),
 - patologie comcomitanti
 - terapie antibiotiche continuative,
 - BMI

3. MATERIALI E METODI

3.1 Il centro Fibrosi Cistica di Treviso

Il campione di pazienti in analisi afferisce al Centro Fibrosi Cistica di Treviso motivo per cui risulta utile fornirne una breve presentazione.

Il Centro Fibrosi Cistica di Treviso viene fondato nel 2004 come realtà di supporto al Centro di riferimento Regionale di Verona. Attualmente i pazienti con Fibrosi Cistica seguiti presso il Centro di Treviso sono 196: 181 pazienti e 15 trapiantati polmonari. Il 30% è rappresentato da pazienti in età pediatrica, il restante 70% ha più di 18 anni. All'interno della struttura vengono seguiti anche pazienti affetti da broncopneumopatie croniche, quali bronchiectasie non FC, discinesia ciliare primaria e broncodisplasia.

Nonostante la popolazione affetta da FC sia sempre più adulta, quasi tutti i centri di riferimento rimangono inseriti in un contesto pediatrico. Il Centro di Treviso, infatti, è fisicamente collocato nel Dipartimento Materno-Infantile e svolge attività di tipo ambulatoriale per tutti i pazienti. I ricoveri tuttavia sono garantiti solo per i pazienti in età evolutiva, per i pazienti adulti, invece, si fa riferimento al Centro Regionale di Verona. Tra i due Centri esiste un collegamento informatico che permette una rapida e sempre aggiornata cogestione dei pazienti, in modo tale da favorire la continuità assistenziale.

Attualmente lavorano in maniera esclusiva presso il Centro le seguenti figure professionali: due medici pediatri, tre infermiere, tre fisioterapisti e una psicologa. All'interno del presidio ospedaliero è stato costituito un network multidisciplinare (diabetologo, otorinolaringoiatra, fisiatra, reumatologo, nefrologo, neuropsichiatra infantile, radiologo, microbiologo, cardiologo, oculista) con i quali il Centro lavora in stretta sinergia, per poter garantire ai pazienti, oltre a continuità terapeutica e più brevi tempi di attesa, una stabilità anche emotiva elemento che in una patologia cronica come la Fibrosi Cistica risulta fondamentale.

3.2 Etica e richieste regolatorie

Questo studio è stato condotto ottemperando a tutte le clausole del protocollo ed è in accordo con i principi definiti dalla 18ma Assemblea Medica Mondiale

(Helsinki, 1964) e successive modificazioni definite dalla 29ma (Tokio, 1975), dalla 35ma (Venezia, 1983), dalla 41ma (Hong Kong, 1989), dalla 48ma (Somerset West - Sud Africa, 1996), dalla 52ma (Edimburgo, 2000) e dalla 59ma (Seul, 2008) Assemblee Mediche Mondiali, nonché in accordo con la nota di chiarimento sul paragrafo 29 che è stata aggiunta nell'Assemblea Generale della WMA, tenutasi a Washington nel 2002 ed in accordo con la revisione del paragrafo 30 della Dichiarazione di Helsinki, tenutasi a Tokio nel 2004.

I pazienti coinvolti nello studio (o i genitori/tutori legali nel caso di pazienti minori) hanno fornito consenso scritto alle procedure attuate nel corso dello studio e autorizzazione al trattamento dei dati (Decreto Legislativo n. 196 del 30 giugno 2003, in materia di tutela dei dati personali).

3.3 Criteri di inclusione/ esclusione e dati trattati

La popolazione in studio è stata individuata in pazienti di entrambi i sessi seguiti dal centro Fibrosi Cistica di Treviso, di età compresa tra i 10 e i 21 anni.

Durante l'anno 2022 i pazienti sono stati identificati dalle cartelle cliniche e sono stati raccolti i dati retrospettivi per il periodo 2019-2021.

I criteri di esclusione comprendevano il trapianto di polmone, ritardo psicomotorio o disturbi dello spettro autistico.

Tutti i pazienti hanno una diagnosi di Fibrosi Cistica confermata da un Test del sudore positivo con concentrazione di cloruro > 60 mmol/L e analisi del DNA che confermano la presenza di un genotipo specifico per la Fibrosi Cistica.

Esami ematici annuali che comprendano anche gli anticorpi IgE totali e specifici contro l'A. fumigatus, sono di solito eseguiti a tutti i pazienti seguiti presso il Centro.

Le colture batteriche e fungine vengono eseguite di routine sull'espettorato o sui tamponi faringei 4 volte all'anno nell'ambito della comune pratica clinica; i campioni delle vie aeree sono elaborati nel laboratorio di microbiologia locale e vengono processati secondo le procedure standard di coltura per FC. La spirometria viene eseguita regolarmente 4 volte all'anno.

3.3.1 Criteri di inclusione

Sono stati considerati eleggibili i soggetti rispettanti i seguenti criteri:

- Paziente con diagnosi di Fibrosi Cistica seguito presso il Centro Fibrosi Cistica di Treviso;
- Età ≥ 10 anni;
- Età < 21 anni;
- Firma da parte del paziente oppure di entrambi i genitori / unico genitore / soggetto esercente la patria potestà del consenso informato
- Firma da parte del paziente e di entrambi i genitori / unico genitore /soggetto esercente la patria potestà del modulo di assenso (pazienti minorenni)

3.3.2 Criteri di esclusione

Sono stati esclusi dallo studio in esame tutti i soggetti con almeno una delle seguenti caratteristiche:

- Paziente sottoposto a trapianto d'organo,
- Pazienti affetti da ritardo psico-motorio o disturbi dello spettro autistico,
- Pazienti con mancanza di dati nell'intervallo di tempo considerato.

3.3.3 Trattamenti permessi

Non sono state poste limitazioni nell'utilizzo dei farmaci normalmente inseriti nel piano terapeutico.

3.4 Caratteristiche della popolazione

I pazienti che frequentano il Centro di Treviso di età compresa tra i 10 e 21 anni, e che quindi potevano esser inclusi in questa analisi, sono in totale 48 ma solo 38 di questi sono stati ritenuti idonei. Sono stati esclusi: 1 paziente sottoposto a trapianto bipolmonare, 2 pazienti con ritardo psicomotorio, 4 pazienti con

diagnosi di CF-spide, 3 pazienti dei quali non erano presenti dati nell'intervallo temporale considerato nel lavoro. (Fig.18)

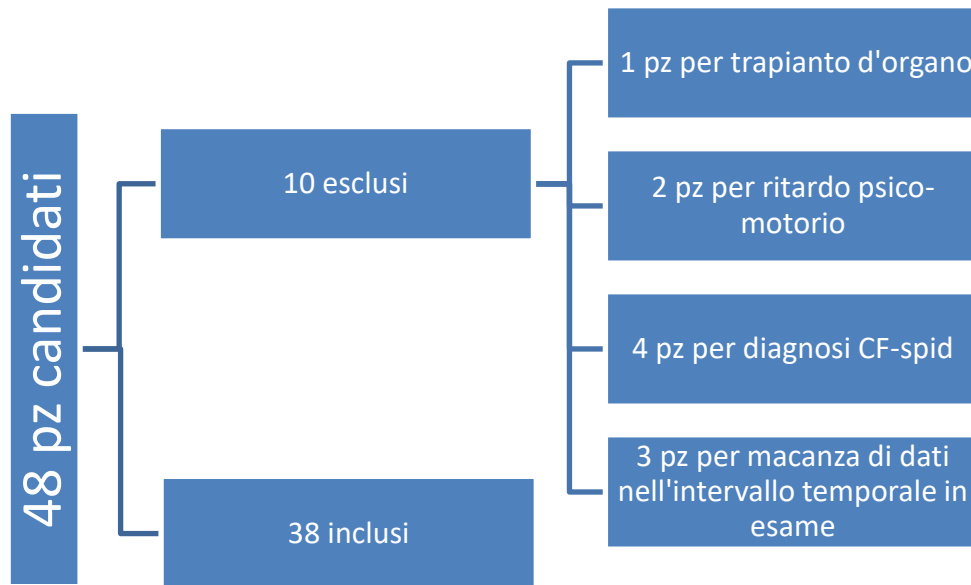


Figura 18- Popolazione candidata all'arruolamento

Le caratteristiche della popolazione in esame al momento dell'arruolamento sono riassunte nella tabella sottostante (Tabella III).

Si può osservare una lieve prevalenza del sesso maschile, con 21 pazienti inclusi, rispetto al sesso femminile con 17 pazienti.

L'età media è di 15,7 anni.

I pazienti in esame sono caratterizzati da un buono stato nutrizionale con un BMI medio di 19,52 (DS 3,09).

In 2 dei soggetti in analisi (5,3%) era presente diabete FC correlato, mentre in 8 pazienti si è rilevata la presenza di epatopatia (21,1%) sulla base di disomogeneità all'imaging ecografico e di alterazioni dei valori degli enzimi epatici agli esami ematici. L'insufficienza pancreatica è stata riscontrata in 31 pazienti (81,6%) e l'osteopenia in 5 (13,2%).

I pazienti al momento dell'arruolamento hanno una funzionalità polmonare conservata con un FEV1% medio del 95,29% (DS 13,28) e una FVC% media del 100,47% (DS 10,13).

Per quanto riguarda le colonizzazioni, lo *Pseudomonas aeruginosa* si trova in 6 pazienti ovvero nel 15,8% della popolazione in esame, mentre *Staphylococcus aureus* in 30 pazienti (78,9%) e *Staphylococcus aureus* Meticillino resistente (MRSA) in 4 pazienti (10,5%). L'*Achromobacter xylosoxidans* è presente nel

5,3% dei pazienti (2 soggetti), lo *Stenotrophomonas maltophilia* nel 7,9% (3 soggetti), *Haemophilus* spp nel 34,2% (13 soggetti). *Burkholderia cepacia* invece non compare come colonizzante. Questi dati epidemiologici sono in linea con la letteratura.

Per quanto riguarda i micobatteri atipici solo un paziente è risultato colonizzato nell'intervallo di tempo considerato (*Micobacterium Abscessus*).

I pazienti colonizzati da *A.fumigatus* sono il 13,2% del totale ovvero 5 pazienti.

Alcuni pazienti presentano più di una colonizzazione. Questi dati relativi alle colonizzazioni si associano a un quadro di patologia polmonare lieve e sono indici di buon controllo delle infezioni. (Tabella III)

CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE ALL'ARRUOLAMENTO	
Numerosità campione (Pz)	38
Età (anni)	15,69 $\pm$ 3,99
Sesso F (%)	17 (44,74%)
BMI	19,52 $\pm$ 3,09
PATOLOGIE INTERCORRENTI	
Diabete FC correlato	2 (5,3%)
Epatopatia	8 (21,1%)
Osteopenia	5 (13,2%)
Insufficienza pancreatica	31 (81,6%)
FEV1(% del valore predetto)	
Mediana	95,18
Range	89,37-105,28
Media (DS)	95,29 $\pm$ 13,28
FVC (%)	
Mediana	98,77
Range	93,10-108,75
Media (DS)	100,47 (10,13)
FEF ₂₅₋₇₅ (% del valore predetto)	
Mediana	88,02
Range	65,32-99,32
Media (DS)	85,29 (26,03)

COLONIZZAZIONI RESPIRATORIE (%)	
P. aeruginosa	6 (15,8%)
S. aureus	30 (78,9%)
SAMR	4 (10,5%)
A. xylosoxidans	2 (5,3%)
S. maltophilia	3 (7,9%)
B. cepacea	0 (0,0%)
Myc atipici	1 (2,6%)
A. fumigatus	5 (13,2%)
Heamophilus spp	13 (34,2%)
Uso di (%)	
Antibiotici inalatori	12 (31,6%)
ICS	1 (2,6%)
ICS/LABA	26 (68,4%)
Broncodilatatori	26 (68,4%)
Mucoattivi	21 (55,3%)
Mucolitici	25 (65,8%)
Antifungini	4 (10,5%)
Modulatori	8 (21,1%)

Tabella III- Caratteristiche della popolazione in esame al momento dell'arruolamento

I valori indicati con $\pm$ indicano media $\pm$ deviazione standard

Fanno uso di antibiotici inalatori 12 pazienti (32,6%), mentre 8 pazienti sono in terapia con modulatori (21,1%). Dai dati si può osservare un uso abbastanza diffuso di broncodilatatori short o long acting che il 68,4% dei soggetti arruolati esegue come parte della terapia di base, più della metà dei pazienti inoltre fa uso di mucoattivi o mucolitici.

La terapia antifungina orale in questa popolazione è stata prescritta a 4 soggetti ovvero al 10,3% dei pazienti in esame.

3.5 Tipo e descrizione dello studio

Lo studio ha un disegno di tipo osservazionale-retrospettivo. Sono stati raccolti dati per il periodo 2019-2021 e sono state analizzate le differenze per quanto riguarda i parametri auxometrici, di funzionalità respiratoria, le patologie intercorrenti, le colonizzazioni e le esacerbazioni tra pazienti con ABPA, i pazienti colonizzati da *A. fumigatus*, i pazienti sensibilizzati, coloro che hanno sviluppato Bronchite aspergillare e i soggetti che non mostravano alcun segno di infezione da *A. fumigatus*.

3.6 Raccolta ed elaborazione dei dati

Sono stati estratti i seguenti dati per l'inquadramento dei pazienti:

- Dati demografici: ID ed iniziali del paziente, genere, data di nascita, età;
- Genetica: prima e seconda mutazione identificate;
- Patologie concomitanti correlate a FC: insufficienza pancreatica, diabete FC correlato, epatopatia, patologia metabolismo osseo;
- Esami ematici (globuli bianchi, eosinofili, PCR, IgE totali, IgE specifiche per *A. fumigatus*, precipitine sieriche specifiche per *A. fumigatus*) data e valore di tutte le misurazioni disponibili nel periodo di osservazione;
- Parametri di funzionalità respiratoria (FVC, FEV₁, MMEF₂₅₋₇₅ percentuali del predetto): data e valore di tutte le misurazioni disponibili nel periodo di osservazione;
- Parametri auxometrici (altezza, peso, BMI);
- Dati sulla colonizzazione: sì/no e tipo di colonizzazione;
- Numero di cicli antibiotici per via orale ed endovena nel periodo preso in esame;
- Numero di cicli steroidei per via orale ed endovena nel periodo preso in esame;
- Trattamenti farmacologici concomitanti valutati:
 - Antibiotici inalatori
 - Antibiotici sistemici
 - Steroidi inalatori
 - Steroidi sistemici

- Broncodilatatori
- Mucoattivi/Mucolitici
- Modulatori
- Antifungini

Tutti i dati inerenti le generalità dei pazienti (ID ed iniziali del paziente, età, genere, data e tipo di diagnosi, tipo di mutazioni), parametri di funzionalità respiratoria, parametri auxometrici, esami colturali su escreato o aspirato ipofaringeo sono stati estratti dalle cartelle cliniche cartacee del Centro Fibrosi Cistica di Treviso e dal database informatizzato presente sul server del Centro di Verona e in rete con Treviso. La consultazione di quest'ultimo è stata possibile grazie ad un accesso online sicuro e con credenziali di sola lettura fornite dal personale del reparto IT.

I pazienti sono stati categorizzati nei vari gruppi secondo le seguenti definizioni. In accordo con lo ISHAM working group è stata posta la diagnosi di Aspergilloso Broncopolmonare Allergica ove venissero rispettati i criteri:

Criteri obbligatori (entrambi devono essere soddisfatti)

- Aumento della concentrazione di IgE totali $>1000\text{IU/mL}$ (ma se il paziente rispetta tutti gli altri criteri un valore di IgE $<1000\text{IU/mL}$ può essere accettato soprattutto se i livelli di IgG specifiche per *A. fumigatus* sono $>27\text{mg/L}$)
- Livelli di IgE specifiche per *A. fumigatus* $>0.35\text{kU/L}$ o positività allo skin prick test per *Aspergillus*.

Altri criteri (almeno due devono essere soddisfatti)

- Elevati livelli di IgG specifiche per *A. fumigatus* ($>27\text{mg/L}$) o presenza di precipitine nel siero.
- Opacità polmonari alle immagini radiografiche coerenti con il sospetto di ABPA
- Eosinofilia in pazienti non sottoposti a terapia steroidea (eosinofili $>500\text{ cell/microL}$), questo reperto può essere anche storico.

Per colonizzazione delle vie respiratorie si intende la positività di almeno tre esami culturali (escreato e/o aspirato ipofaringeo) in 6 mesi consecutivi, per quanto riguarda lo *Pseudomonas Aeruginosa*, mentre sono sufficienti due positività in 12 mesi consecutivi per i restanti patogeni indagati compreso l'*Aspergillus fumigatus*. Per rientrare nel gruppo di soggetti colonizzati da *A. fumigatus* i pazienti con identificazione di due o più escreti positivi in un anno non devono presentare nuovi sintomi respiratori e positività alle IgG sieriche specifiche¹⁶⁷.

La sensibilizzazione agli antigeni dell'aspergillo (AS) è definita dalla presenza di una positività allo skin prick test o da un aumento dei livelli di IgE specifiche per *A. fumigatus* nel siero con solo un lieve aumento delle IgE totali¹⁵³.

La diagnosi di Bronchite aspergillare è stata posta quando le precipitine aspergillo specifiche risultano positive con associato un deterioramento clinico ma nessun altro criterio diagnostico per ABPA viene rispettato, questa condizione indica la presenza di infezione da parte di *A. fumigatus* ma non una risposta immunologica alla presenza dello stesso¹⁶⁸.

Per quanto riguarda le esacerbazioni sono state definite come eventi che richiedevano un ciclo di terapia antibiotica. Tale trattamento era motivato da peggioramento delle condizioni cliniche generali e/o dei sintomi respiratori o sulla base della riduzione della funzione polmonare alla spirometria.

Le equazioni di riferimento della Global Lung Function Initiative (GLI)-2012 sono state usate per determinare la FEV1 %in base all'età, al sesso, all'altezza e etnia.

3.7 Analisi statistica

Le variabili che sono state registrate nello studio sono presentate utilizzando la statistica descrittiva più appropriata alla loro natura. Le variabili quantitative continue (età, BMI, parametri spirometrici, numero di esacerbazioni e di ricoveri) sono state descritte mediante media $\pm$ deviazione standard per i dati a distribuzione Normale, mediana, range interquartile per i dati a distribuzione NonNormale, mentre le variabili qualitative (dati delle colonizzazioni batteriche e genetica) mediante distribuzioni di frequenza assolute e relative.

È stata effettuata un'analisi descrittiva dei dati in quanto non è stato possibile effettuare una comparazione mediante test statistici a causa della numerosità limitata del gruppo con ABPA.

4. RISULTATI

196 pazienti affetti da Fibrosi Cistica erano regolarmente seguiti al centro Fibrosi Cistica di Treviso al momento dell'arruolamento, di questi 38 rispettavano i criteri necessari per essere inclusi nell'analisi.

4.1 Prevalenza di patologie correlate ad *A. fumigatus*

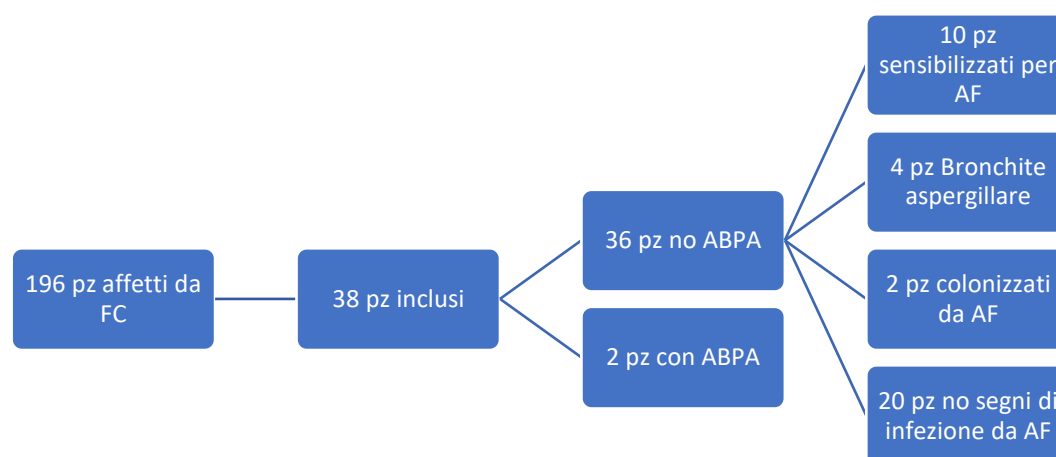


Figura18- Suddivisione nei gruppi d'interesse della popolazione in esame

Al momento dell'arruolamento solo 2 pazienti (5,3%) rispettavano i criteri per la diagnosi di Aspergillosi Broncopolmonare Allergica, mentre tra i 36 pazienti che non mostravano segni di ABPA sono stati identificati 10 pazienti sensibilizzati per gli antigeni di *A. fumigatus* (26,4% del totale), 4 pazienti con diagnosi di Bronchite aspergillare (10,5% del totale) e 2 pazienti colonizzati da *A. fumigatus*. 20 (52,8%) soggetti non presentavano alcun segno di infezione da *A. fumigatus*. Nel periodo di osservazione alcuni pazienti (5) hanno cambiato gruppo di appartenenza, in particolare due pazienti che inizialmente rispettavano i criteri di diagnosi per ABPA in seguito al trattamento farmacologico antifungino hanno riportato un miglioramento dei valori agli esami ematici perciò al momento dell'arruolamento (2021) risultano parte del gruppo di soggetti sensibilizzati e non con ABPA. Inoltre all'interno del periodo in esame un paziente sensibilizzato per gli antigeni di AF vede abbassarsi spontaneamente, in assenza di trattamento, il livello di IgE specifiche per AF e quindi nel 2021 fa parte del gruppo di pazienti

che non hanno alcun segno di infezione da *A. fumigatus*. Un soggetto colonizzato invece, manifesta i primi segni di sensibilizzazione all'interno del periodo e perciò viene considerato facente parte di tale categoria al momento dell'arruolamento. Infine un paziente che inizialmente rispettava i criteri di diagnosi per Bronchite aspergillare alla fine dell'intervallo di tempo ha tutti i valori degli esami considerati nella norma e perciò rientra nel gruppo di coloro che non manifestano segni di infezione da *A. fumigatus*.

In base alle caratteristiche cliniche e laboratoristiche si possono individuare 5 stadi di ABPA:

Stadio 1 *fase acuta*: sono presenti le caratteristiche tipiche della patologia (IgE totali elevate e IgE specifiche per *A. fumigatus*, IgG specifiche per *A. fumigatus*, caratteristiche radiologiche tipiche, eosinofilia periferica)

Stadio 2 *fase di remissione*: il paziente è asintomatico, non ci sono nuovi infiltrati alle immagini radiologiche, non c'è stato aumento delle IgE totali per almeno 6 mesi, o se l'aumento si è verificato si è mantenuto <50%, in assenza di terapia antifungina o steroidea.

Stadio 3 *esacerbazione*: appaiono nuovi infiltrati polmonari con eosinofilia e raddoppio dei livelli di IgE rispetto alla fase di remissione, il paziente presenta un deterioramento delle condizioni cliniche e un aumento della tosse produttiva con necessità di terapia antifungina o steroidea.

Stadio 4 *malattia steroide-dipendente*: il paziente riceve alte dosi di terapia steroidea sistemica a lungo termine e qualora si tenti di scalare e eventualmente sospendere la terapia il paziente recidiva.

Stadio 5 *fibrosi polmonare*: radiografie del torace o immagini TAC mostrano fibrosi irreversibile e bronchiectasie diffuse¹⁵⁷.

Entrambi i pazienti con ABPA in questa casistica si trovano in Stadio 2 ovvero in fase di remissione.

Nella tabella IV si può osservare la suddivisione dei pazienti nei vari gruppi, le rispettive caratteristiche demografiche e genetiche e i dati riguardanti la funzione

polmonare, le comorbidità, le colonizzazioni e il piano terapeutico di base per ogni categoria.

	No ABPA					ABPA n=2
	No segni di AF (n=20)	Sensibilizzati (n=10)	Colonizzati (n=2)	Bronchite aspergillare (n=4)	Totale no ABPA (n=36)	
Età media±DS	14,09±3,93	16,35± 3,58	19,89±2,38	17,65±2,85	15,44±3,94	20,32±1,29
Sesso						
M (%)	12 (60)	5 (50)	0 (0)	2 (50)	19 (52,78)	2 (100)
F (%)	8 (40)	5 (50)	2 (100)	2 (50)	17 (47,22)	0 (0)
BMI						
media±DS	19,28±3,65	18,97±2,16	22,35±0,94	18,59±0,59	19,29±3,02	23,56±0,41
mutazione						
CFTR						
homo-F508del	3 (15)	4 (40)	1 (50)	0 (0)	8 (22,2)	1 (50)
hetero-F508del	8 (40)	3 (30)	0 (0)	4 (100)	15 (41,7)	1 (50)
altre	9 (45)	3 (30)	1 (50)	0 (0)	13 (31,1)	0 (0)
FEV 1 % del predetto	97,63±14,77	92,51±12,53	87,94±6,01	91,85±13,45	95,03±13,61	100±1,08
Delta FEV1% 2021-2019	-0,65±6,96	3,49±6,05	-0,24±5,51	4,15±4,94	0,91±6,62	-0,88,±1,81
Comorbidità						
Insuff.pancreatica	13 (65)	10 (100)	2 (100)	4 (100)	29 (80,6)	2 (100)
Diabete FC	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	2 (5,6)	0 (0)
Epatopatia	3 (15)	3 (30)	1 (50)	1 (25)	8 (22,2)	0 (0)
Osteopenia	2 (10)	1 (10)	0 (0)	2 (50)	5 (13,9)	0 (0)
Colonizzazioni						
P. aeruginosa	1 (5)	2 (20)	1 (50)	1 (25)	5 (13,9)	1 (50)
SAMS	17 (85)	6 (60)	2 (100)	4 (100)	29 (80,6)	1 (50)
SAMR	2 (10)	1 (10)	1 (50)	0 (0)	4 (11,1)	0 (0)
A.xylosoxidans	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,6)	0 (0)
S. maltophila	1 (5)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	3 (8,3)	0 (0)
B. cepacea	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0,0)	0 (0)
Myc atipici	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)
A. fumigatus	0 (0)	0 (0)	2 (100)	3 (75)	5 (13,9)	0 (0)
Terapia						
Atb inalatori	5 (25)	2 (20)	2 (100)	2 (50)	11 (30,6)	1 (50)
Modulatori	2 (10)	4 (40)	1 (50)	0 (0)	7 (19,4)	1 (50)
ICS	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)
ICS/LABA	12 (60)	8 (80)	2 (100)	3 (75)	25 (69,4)	1 (50)
Broncodilatatori	12 (60)	8 (80)	2 (100)	3 (75)	25 (69,4)	1 (50)
Mucoattivi	8 (40)	7 (70)	2 (100)	3 (75)	20 (55,6)	1 (50)
Mucolitico	10 (50)	8 (80)	2 (100)	4 (100)	24 (66,7)	1 (50)
Antifungini	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1 (25)	2 (5,6)	2 (100)

Tabella IV-Caratteristiche della popolazione in esame al momento dell'arruolamento (2021): dati demografici, della funzione polmonare, delle colonizzazioni, delle patologie concomitanti e delle terapie divisi per gruppi. I valori indicati con $\pm$ indicano media $\pm$ deviazione standard.

	No segni di AF (n=20)	Colonizzati (n=2)	Sensibilizzati (n=10)	Bronchite aspergillare (n=4)	ABPA (n=2)
Globuli bianchi	8,08 $\pm$ 2,60	8,51	8,99 $\pm$ 2,04	7,87 $\pm$ 1,77	9,23 $\pm$ 0,85
G. eosinofili	0,15 $\pm$ 0,06	0,17	0,27 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,03
PCR	0,15 $\pm$ 0,20	0,04	0,21 $\pm$ 0,13	0,76 $\pm$ 1,06	0,23 $\pm$ 0,02
IgE totali	28,2 $\pm$ 26,96	65,1	284,19 $\pm$ 265,38	122,8 $\pm$ 165,41	1331,38 $\pm$ 101,64
RAST AF	0,06 $\pm$ 0,02	0,25	9,82 $\pm$ 10,34	0,20 $\pm$ 0,29	35,15 $\pm$ 19,80
Precipitine Presenti(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	0 (0)

Tabella V- Dati laboratoristici dei pazienti al momento dell'arruolamento divisi per gruppi. I valori indicati con $\pm$ indicano media $\pm$ deviazione standard

4.2 Dati generali

Nel campione in esame si può notare come il gruppo di pazienti a cui è stata diagnosticata l'ABPA abbia un'età maggiore rispetto agli altri gruppi con un'età media di 20,32 anni (DS 1,29), in particolare rispetto al gruppo senza segni di infezione da *A. fumigatus* il quale presenta l'età media inferiore in assoluto all'interno dei gruppi analizzati, con un'età media di 14,09 anni (DS 3,93).

Nel gruppo di pazienti con diagnosi di ABPA si può notare una completa prevalenza del sesso maschile tuttavia è necessario specificare la limitata numerosità di questo gruppo. Per quanto riguarda invece il gruppo dei pazienti sensibilizzati, dei pazienti con Bronchite aspergillare e dei pazienti senza segni di infezione da *A. fumigatus* la distribuzione del genere risulta omogenea.

Sono state osservate inoltre le mutazioni del gene CFTR caratterizzanti i soggetti in esame e come queste si distribuiscono all'interno dei vari gruppi individuati. Le mutazioni sono state raggruppate all'interno di tre categorie: omozigosi F508del, eterozigosi F508del e altre mutazioni.

Il gruppo dei pazienti con ABPA è composto da un soggetto con mutazione F508del in omozigosi e un soggetto con mutazione F508del in eterozigosi.

La mutazione F508del è frequente anche tra i pazienti con sensibilizzazione per gli antigeni di *A. fumigatus*, che si ricorda essere considerata una fase pre-ABPA,

in questo caso sono stati individuati quattro pazienti con tale mutazione in omozigosi e altri tre in eterozigosi, solo tre pazienti in questo gruppo non presentavano la mutazione F508del. In generale si può osservare che la mutazione F508del in omozigosi ed eterozigosi è tendenzialmente più presente nelle categorie con segni di Aspergillosi.

4.3 Patologie concomitanti

Per quanto riguarda le patologie intercorrenti si è posta l'attenzione su quattro categorie principali: l'insufficienza pancreatica, il diabete correlato alla Fibrosi Cistica, l'epatopatia correlata alla Fibrosi Cistica e patologia del metabolismo osseo (osteopenia).

Si può dunque notare come i pazienti affetti da ABPA, in questa indagine, risultino entrambi insufficienti pancreatici ma non presentino altre comorbidità.

Anche i soggetti sensibilizzati, affetti da Bronchite aspergillare e colonizzati sono tutti affetti da insufficienza pancreatica, mentre nel gruppo composto dai pazienti che non presentano alcun segno di *A. fumigatus* la prevalenza di insufficienza pancreatica è del 65%. (Tab VI)

Nel campione analizzato sono stati individuati due soli pazienti affetti da diabete associato alla Fibrosi Cistica ed entrambi fanno parte del gruppo dei soggetti sensibilizzati agli antigeni di *A. fumigatus*. (Tab VI)

Nella popolazione analizzata otto pazienti hanno ricevuto la diagnosi di epatopatia associata alla Fibrosi Cistica e sono distribuiti come segue: tre fanno parte dei soggetti sensibilizzati (30% di questi), tre appartengono al gruppo senza segni di *A. fumigatus* (15%), un soggetto risulta colonizzato, l'ultimo paziente invece appartiene al gruppo dei soggetti con Bronchite aspergillare (25%). (Tab VI)

È stata ricercata anche la presenza di osteoporosi e osteopenia nel campione in esame: nessun paziente è risultato affetto da osteoporosi mentre cinque soggetti sono considerati osteopenici. Due pazienti affetti da osteopenia appartengono al gruppo dei soggetti con Bronchite aspergillare (che corrisponde al 50% dei pazienti appartenenti a questo gruppo), un paziente osteopenico fa parte dei soggetti sensibilizzati (10%) mentre altri due soggetti non manifestano alcun segno di infezione da *A. fumigatus* (10%).(Tab VI)

	No segni di AF (n=20)	Sensibilizzati (n=10)	Colonizzati (n=2)	Bronchite aspergillare (n=4)	Totale no ABPA (n=36)	ABPA
Comorbidità						
Insuff.pancreatica	13 (65)	10 (100)	2 (100)	4 (100)	29 (80,6)	2 (100)
Diabete FC	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	2 (5,6)	0 (0)
Epatopatia	3 (15)	3 (30)	1 (50)	1 (25)	8 (22,2)	0 (0)
Osteopenia	2 (10)	1 (10)	0 (0)	2 (50)	5 (13,9)	0 (0)

Tabella VI – patologie concomitanti nella popolazione in esame al momento dell'arruolamento divise per gruppi. I dati sono espressi in valore assoluto e percentuale.

Osservando il gruppo di pazienti sensibilizzati si può dunque constatare che questi risultino più spesso affetti da insufficienza pancreatica (+35%), diabete associato alla Fibrosi Cistica (+20%) e epatopatia (+15%), qualora vengano confrontati con pazienti che non manifestano alcun segno di infezione da *A. fumigatus* (Tab VII). Similmente quando il gruppo di pazienti affetti da bronchite aspergillare viene confrontato con il gruppo di pazienti senza segni di infezione da *A. fumigatus* si può notare che vi sia una percentuale maggiore di pazienti con insufficienza pancreatica (+35%), epatopatia (+10%) e osteopenia (+40%). (Tab VII)

Differenza SENSIBILIZZAZIONE AF E NON SEGNI AF	
Insuff pancreatica	+35
Diabete FC	+20
Epatopatia	+15
Osteopenia	0
Differenza BRONCHITE AF E NON SEGNI AF	
Insuff. pancreatica	+35
Diabete FC	0
Epatopatia	+10
Osteopenia	+40

Tabella VII – Differenze percentuali della prevalenza delle patologie concomitanti tra i vari gruppi. I valori indicati con $\pm$ indicano media $\pm$ deviazione standard

In generale comunque, a parte l'insufficienza pancreatica, le patologie concomitanti sono abbastanza equamente distribuite tra le categorie che presentano segni di Aspergillosi; si nota solo una lieve prevalenza rispetto al gruppo dei pazienti non AF.

4.4 Funzionalità respiratoria

FEV1% e delta FEV1% 2021-2019

I pazienti affetti da ABPA al momento dell'arruolamento presentano un FEV1% medio del 100,01% (DS 1,08) e un delta FEV1% medio calcolato nel periodo 2021-2019 di -0,88% (DS 1,81). Quando questi dati vengono confrontati con il gruppo di pazienti sensibilizzati si nota che i soggetti con ABPA hanno un FEV1% maggiore del 7,49% rispetto ai sensibilizzati ma anche un declino nel triennio maggiore rispetto a questi, infatti il gruppo dei sensibilizzati nell'intervallo di tempo esaminato mostra in media un recupero del 3,49% di FEV1% e ciò comporta un aumento sostanziale della differenza tra i due gruppi per quanto riguarda i delta FEV1% calcolati nel periodo 2021-2019.(Tab VIII-IX)

Nel confrontare il gruppo di pazienti affetti da ABPA con i pazienti colonizzati si può osservare che i pazienti con ABPA hanno un FEV1% del 12,7% maggiore rispetto ai colonizzati tuttavia, anche in questo caso, la differenza media del declino del FEV1%2021-2019 è negativa (-0,64%), ciò significa che i pazienti con ABPA hanno avuto una riduzione del FEV1% nel periodo maggiore rispetto a quella che si è verificata nel gruppo dei colonizzati.(Tab IX)

Paragonando il gruppo con ABPA con il gruppo di pazienti affetti da Bronchite aspergillare si riscontra una situazione analoga alle precedenti, in cui la FEV1% risulta maggiore del 8,15% nei pazienti con ABPA ma anche qui il declino della FEV1% nel triennio rimane maggiore per i pazienti con ABPA (-5,3%) rispetto ai pazienti con Bronchite aspergillare. Anche nei confronti tra i pazienti con ABPA e i pazienti senza alcun segno di infezione da *A. fumigatus* e tra i pazienti con ABPA e il totale dei pazienti senza ABPA si ripropone lo stesso schema: la FEV1% nel 2021 è maggiore nel gruppo con ABPA ma si è rilevato un declino maggiore del FEV1% nel periodo preso in esame. (Tab IX)

	No segni di AF (n=20)	Sensibilizzati (n=10)	Colonizzati (n=2)	Bronchite aspergillare (n=4)	Totale no ABPA (n=36)	ABPA
FEV 1 % del predetto	97,63±14,77	92,51±12,53	87,94±6,01	91,85±13,45	95,03±13,61	100±1,08
Delta FEV1% 2021-2019	-0,65±6,96	3,49±6,05	-0,24±5,51	4,15±4,94	0,91±6,62	-0,88,±1,81

Tabella VIII – FEV1% del predetto al momento dell'arruolamento e deltaFEV1% nel triennio divisi per gruppi. I valori indicati con ± indicano media ± deviazione standard.

ABPA vs NON ABPA	
Differenza media FEV1% pred 2021	+4,98
Differenza media declino FEV12021-2019	-1,79
ABPA vs SENSIBILIZZATI AF	
Differenza media FEV1% pred 2021	+7,49
Differenza media declino FEV12021-2019	-4,38
ABPA vs COLONIZZATI AF	
Differenza media FEV1% pred 2021	+12,07
Differenza media declino FEV12021-2019	-0,64
ABPA vs BRONCHITE AF	
Differenza media FEV1% pred 2021	+8,15
Differenza media declino FEV12021-2019	-5,03
ABPA vs NON SEGNI AF	
Differenza media FEV1% pred 2021	+2,38
Differenza media declino FEV12021-2019	-0,23

Tabella IX – Differenze percentuali di FEV1% e del Declino FEV1₂₀₂₁₋₂₀₁₉ tra i vari gruppi

In generale si nota nel gruppo di ABPA un maggior declino negli anni della funzione polmonare rispetto a tutti gli altri gruppi, anche se il valore di partenza è più elevato.

Un dato da segnalare riguarda il gruppo di pazienti sensibilizzati agli antigeni del fungo, questi avevano nel 2021 una FEV1% del pred. media del 92,51% (DS 12,53) e un deltaFEV1%₂₀₂₁₋₂₀₁₉ del +3,49% (DS 6,05).

L'aumento di FEV1% nel triennio all'interno del gruppo dei soggetti sensibilizzati potrebbe essere condizionato dal fatto che quattro pazienti nel periodo di osservazione hanno iniziato terapia con farmaci modulatori.

4.5 Cicli antibiotici e steroidei mensili

I pazienti con ABPA durante il 2021 sono stati sottoposti in media a solo 0,04 cicli di antibiotico orale al mese e a nessun ciclo di antibiotico endovenoso, né ad alcun ciclo di steroidi orali o endovenosi. Quando questi dati vengono posti in parallelo con il tasso di cicli antibiotici e steroidei mensili prescritti ai pazienti

senza ABPA si può notare che in realtà, nel 2021, siano stati proprio i pazienti degli altri gruppi a eseguire un numero maggiore di cicli sia antibiotici che steroidei, sia orali che endovenosi.(Tab X)

Nel confrontare i gruppi dei soggetti sensibilizzati o con Bronchite aspergillare con coloro che non mostrano alcun segno di infezione da *A. fumigatus* si può osservare che i primi due gruppi hanno un tasso maggiore di cicli antibiotici e steroidei sia orali che endovenosi.(Tab X)

Differenze cicli antibiotici e steroidei ABPA vs NON ABPA 2021	
atb os/mese	-0,04
atb ev/mese	-0,03
steroidi os/mese	-0,03
steroidi ev/mese	0,00
Differenze cicli antibiotici e steroidei SENSIBILIZZAZIONE AF vs NON SEGNI AF 2021	
atb os/mese	+0,04
atb ev/mese	-0,02
steroidi os/mese	+0,02
steroidi ev/mese	0,00
Differenze cicli antibiotici e steroidei BRONCHITE AF vs NON SEGNI AF 2021	
atb os/mese	+0,08
atb ev/mese	+0,03
steroidi os/mese	0,00
steroidi ev/mese	+0,02

Tabella X – Differenze del numero di cicli antibiotici e steroidei mensili tra i vari gruppi

Da segnalare che comunque nel periodo considerato i soggetti con ABPA erano in fase di remissione (Stadio 2) e questo può spiegare il numero così limitato di cicli antibiotici e steroidei.

4.6 Colonizzazioni

Nel 2021 all'interno dell'intera popolazione presa in esame si possono contare cinque colonizzazioni da *Aspergillus fumigatus*: tre di questi pazienti fanno parte del gruppo di soggetti che hanno sviluppato Bronchite aspergillare mentre gli altri due costituiscono il gruppo di coloro che sono solamente colonizzati.

Nel gruppo con ABPA non sono presenti soggetti colonizzati dal fungo, e ciò è verosimilmente effetto della terapia impostata per questi pazienti, anche tra i soggetti sensibilizzati non sono presenti pazienti colonizzati da *A. fumigatus*.

Per quanto concerne le colonizzazioni da parte di altri patogeni si ricorda essere stati presi in esame: *P. aeruginosa*, *S. aureus* (SAMS), *S. aureus* meticillino resistente (SAMR), *A. xylosoxidans*, *S. maltophila*, *B. cepacea* e i micobatteri atipici.

Tra i soggetti affetti da ABPA è presente un paziente con co-infezione da *P. aeruginosa* e SAMS, mentre nell'altro paziente al momento dell'arruolamento non sono rilevabili patogeni colonizzanti.

All'interno del gruppo dei soggetti sensibilizzati sono stati individuati due pazienti colonizzati da *P. aeruginosa*, sei pazienti colonizzati da SAMS e uno da SAMR, infine un paziente risulta colonizzato da *Mycobacterium abscessus*; in questo gruppo l'unica co-infezione riguarda il paziente colonizzato da *M. abscessus* che presenta al contempo anche una colonizzazione da *P. aeruginosa*.

Per quanto riguarda il gruppo composto dai soggetti affetti da Bronchite aspergillare si può notare che un paziente è colonizzato da *P. aeruginosa*, due pazienti sono colonizzati da *S. maltophila* e tutti i pazienti sono colonizzati da SAMS.

Nel gruppo dei soggetti colonizzati da *A. fumigatus* sono state individuate ulteriori colonizzazioni: un paziente presenta una colonizzazione da *P. aeruginosa*, entrambi sono colonizzati da SAMS e un soggetto anche da SAMR.

Analizzando infine il gruppo di pazienti che non presenta alcun segno di *A. fumigatus* si può notare che un paziente presenta co-infezione da *P. aeruginosa* e SAMS, un soggetto presenta co-infezione da SAMR e *A. xylosoxidans* mentre un terzo paziente presenta una triplice colonizzazione da SAMR, *A. xylosoxidans* e *S. maltophila*, infine altri quattordici pazienti in questo gruppo risultano colonizzati da SAMS. (Tab XI)

	No segni di AF (n=20)	Sensibilizzati (n=10)	Colonizzati (n=2)	Bronchite aspergillare (n=4)	Totale no ABPA (n=36)	ABPA
Colonizzazioni						
P. aeruginosa	1 (5)	2 (20)	1 (50)	1 (25)	5 (13,9)	1 (50)
SAMS	17 (85)	6 (60)	2 (100)	4 (100)	29 (80,6)	1 (50)
SAMR	2 (10)	1 (10)	1 (50)	0 (0)	4 (11,1)	0 (0)
A.xylosoxidans	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,6)	0 (0)
S. maltophila	1 (5)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	3 (8,3)	0 (0)
B. cepacea	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0,0)	0 (0)
Myc atipici	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)
A. fumigatus	0 (0)	0 (0)	2 (100)	3 (75)	5 (13,9)	0 (0)

Tabella XI - colonizzazioni nella popolazione in esame al momento dell'arruolamento divise per gruppi. I dati sono espressi in valore assoluto e percentuale.

Nel comparare il gruppo dei sensibilizzati con coloro che non hanno segni di A. fumigatus si può osservare che nei pazienti sensibilizzati sono più frequenti colonizzazioni da P. aeruginosa (+20%), SAMS (+15%), S. Maltophila (+45%) ma meno frequenti colonizzazioni da SAMR (-10%) e A. xylosoxidans (-10%). Nel campione in analisi quando viene raffrontato il gruppo dei pazienti con Bronchite aspergillare con coloro che non hanno segni di infezione da A. fumigatus si trova un quadro identico a quello del confronto precedente tra i pazienti sensibilizzati e i pazienti senza segni di A. fumigatus. (TAB XII)

La colonizzazione da P. aeruginosa in questa popolazione sembra essere più presente nel gruppo di soggetti con ABPA quando vengono posti in parallelo con i restanti gruppi e nei gruppi di pazienti sensibilizzati e con Bronchite aspergillare quando vengono confrontati con i pazienti che non hanno alcun segno di infezione da A. fumigatus. (TAB XI-XII)

Confrontando infine le altre colonizzazioni tra i restanti gruppi non sono state osservate differenze rilevanti nella loro distribuzione.

DIFFERENZE COLONIZZAZIONI tra ABPA vs NON ABPA	
PA	+36,1
SAMS	-30,6
SAMR	-11,1
A. Xylosoxidans	-5,6
S. Maltophila	-8,3
B. Cepacea	0,0
Myc atipici	-2,8
DIFFERENZE COLONIZZAZIONI tra SENSIBILIZZAZIONE AF e NON SEGNI AF	
PA	+20
SAMS	+15
SAMR	-10
A. Xylosoxidans	-10
S. Maltophila	+45
B. Cepacea	0
Myc atipici	0
DIFFERENZE COLONIZZAZIONI tra BRONCHITE AF e NON SEGNI AF	
PA	+20
SAMS	+15
SAMR	-10
A. Xylosoxidans	-10
S. Maltophila	+45
B. Cepacea	0
Myc atipici	0

Tabella XII – Differenze percentuali tra le colonizzazioni nei vari gruppi.

4.7 Trattamenti nell'anno 2021

Nella coorte analizzata in questo lavoro fanno uso di antibiotici inalatori dodici pazienti (31,6%), di questi solo uno è un soggetto affetto da ABPA, due sono pazienti sensibilizzati agli antigeni aspergillari, due pazienti fanno parte del gruppo con Bronchite aspergillare, due sono colonizzati da *A. fumigatus* e cinque appartengono al gruppo di pazienti che non mostra segni di infezione da *A. fumigatus*. (TAB XIII)

I farmaci modulatori di CFTR sono stati prescritti a otto pazienti nella popolazione individuata, di questi un paziente è affetto da ABPA, cinque appartengono alle categorie con segni aspergillo e due alla popolazione non AF.

Naturalmente gli antifungini sono stati prescritti ad entrambi i soggetti con ABPA, mentre per quanto riguarda gli altri gruppi sono stati ritenuti idonei al trattamento

di un soggetto con Bronchite aspergillare e un soggetto sensibilizzato agli antigeni di *A. fumigatus*.

	No segni di AF (n=20)	Sensibilizzati (n=10)	Colonizzati (n=2)	Bronchite aspergillare (n=4)	Totale no ABPA (n=36)	ABPA
Terapia						
Atb inalatori	5 (25)	2 (20)	2 (100)	2 (50)	11 (30,6)	1 (50)
Modulatori	2 (10)	4 (40)	1 (50)	0 (0)	7 (19,4)	1 (50)
ICS	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)
ICS/LABA	12 (60)	8 (80)	2 (100)	3 (75)	25 (69,4)	1 (50)
Broncodilatatori	12 (60)	8 (80)	2 (100)	3 (75)	25 (69,4)	1 (50)
Mucoattivi	8 (40)	7 (70)	2 (100)	3 (75)	20 (55,6)	1 (50)
Mucolitico	10 (50)	8 (80)	2 (100)	4 (100)	24 (66,7)	1 (50)
Antifungini	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1 (25)	2 (5,6)	2 (100)

Tabella XIII – Distribuzione assoluta e percentuale dei trattamenti inseriti nel piano terapeutico di base nei vari gruppi.

Nella popolazione analizzata, dei dodici pazienti in terapia con antibiotici inalatori, sette appartengono alle categorie con segni di Aspergillosi e cinque ai non AF. Non si nota quindi una associazione significativa tra utilizzo di antibiotici inalatori e patologia correlata a fungo.

4.8 BMI e z-BMI

BMI e z-BMI sono stati analizzati nel confronto tra i gruppi in esame in quanto indici dello stato di nutrizione dei pazienti.

Nella popolazione indagata il gruppo di pazienti affetti da ABPA sembra avere BMI e z-BMI sempre maggiori rispetto agli altri gruppi, infatti nel confronto tra i pazienti con ABPA e tutti coloro che non hanno sviluppato la complicanza si nota che i primi hanno un BMI di 4,26 punti maggiore e uno z-BMI di 0,62 punti maggiore. (TAB XIV)

Qualora si pongano a raffronto invece, i gruppi dei pazienti sensibilizzati e quello dei pazienti con Bronchite aspergillare con i soggetti senza alcun segno di infezione da *A. fumigatus* si osserva che i primi due gruppi hanno entrambi BMI e z-BMI inferiori rispetto ai pazienti senza alcun segno di *A. fumigatus*. (TAB XIV)

Confrontando infine il BMI e z-BMI tra i restanti gruppi non abbiamo osservato differenze rilevanti.

Differenza ABPA e NON ABPA	
differenza media BMI	4,26
differenza media z-BMI	0,622
Differenza SENSIBILIZZAZIONE AF e NON SEGNI AF	
differenza media BMI	-0,31
differenza media z-BMI	-0,439
Differenza BRONCHITE AF e NON SEGNI AF	
differenza media BMI	-0,69
differenza media z-BMI	-0,863

Tabella XIV – Differenze tra le medie dei BMI e z-BMI nei vari gruppi

5. DISCUSSIONE

Questo lavoro si poneva l'obiettivo di identificare, nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica afferenti al Centro di Treviso, la prevalenza di colonizzazione da *A. fumigatus*, di sensibilizzazione allergica al fungo, di Bronchite aspergillare e di ABPA nella popolazione pediatrica.

Ci sono pochi lavori in letteratura che fanno questo tipo di analisi in quanto la Fibrosi Cistica è malattia rara e l'ABPA, essendo una sua complicanza, si presenta con frequenza ancora minore, soprattutto in giovane età. Inoltre un'altra difficoltà nell'analizzare questa patologia è legata all'eterogeneità nelle classificazioni. I lavori scientifici si sono focalizzati nella maggior parte dei casi in popolazioni più ampie come quella degli asmatici.

In questa indagine sono stati considerati i criteri diagnostici proposti dall' ISHAM per porre la diagnosi di ABPA.

Nel nostro lavoro al momento dell'arruolamento la prevalenza di ABPA nella popolazione in esame è risultata del 5,3%, mentre la prevalenza di sensibilizzazione si è attestata al 26,4%, quella di Bronchite aspergillare è risultata del 10,5% e la prevalenza di soggetti con colonizzazione è stata del 5,3%.

Una meta-analisi basata sull'elaborazione di dati provenienti da 64 studi originali ha stimato una prevalenza di sensibilizzazione agli antigeni aspergillari nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica variabile tra il 20% e il 65% con una pooled prevalence calcolata del 39,1%, mentre lo stesso studio per quanto riguarda la prevalenza di ABPA nei pazienti con Fibrosi Cistica indica che possa variare dal 3% al 25% con una pooled prevalence del 8,9%, in entrambi i casi la prevalenza riscontrata nel campione esaminato in questo lavoro si pone all'interno degli intervalli identificati ma al di sotto delle pooled prevalence indicate nella metanalisi. Gli autori di tale lavoro sottolineano come la prevalenza di sensibilizzazione agli antigeni di *A. fumigatus* sia simile tra adulti e bambini suggerendo che questo sia un evento che avviene precocemente nella storia di malattia, mentre la prevalenza di ABPA risulta significativamente maggiore negli adulti e perciò viene considerato un evento successivo. La minor prevalenza di ABPA nella popolazione pediatrica appare concorde con i dati riscontrati nel nostro lavoro¹⁵³.

Tuttavia è complesso determinare la prevalenza reale della sensibilizzazione e dell'ABPA nei pazienti con FC in quanto nel corso degli anni sono stati adottati numerosi criteri diagnostici e ciò può aver agito come confondente. La ragione dell'eterogeneità dei risultati potrebbe essere ricercata anche nel fatto che ogni studio si focalizzava su pazienti appartenenti a diverse fasce d'età e provenienti da diverse aree geografiche¹⁵³.

Per quanto riguarda la prevalenza di Bronchite aspergillare è stata stimata una prevalenza del 9% tra i pazienti affetti da Fibrosi Cistica e nella popolazione esaminata in questo lavoro tale dato risulta simile attestandosi al 10,5%¹⁶⁸.

È stato ipotizzato che la sensibilizzazione sia una condizione che precede lo sviluppo di Aspergillosi Broncopolmonare Allergica vera e propria, in quanto la letteratura appare concorde nell'indicare che la prevalenza di soggetti sensibilizzati sia comparabile in età pediatrica e in età adulta, mentre la prevalenza di ABPA risulta significativamente maggiore tra gli adulti. Pur considerando che questo studio si basa su una bassa numerosità campionaria, tale trend viene rispettato anche in questa popolazione, infatti l'età media dei pazienti con ABPA è di 20,32 anni (DS 1,29) mentre è di 16,35 anni (DS 3,58) per i pazienti sensibilizzati¹⁵³.

La scelta di includere pazienti d'età compresa tra i 10 ei 21 anni riflette la necessità di indagare entrambe le categorie di pazienti con un focus su una fascia d'età in cui è verosimile che i pazienti possano passare dal gruppo dei sensibilizzati a quello con ABPA. Si è deciso di porre come limite inferiore d'età i 10 anni perché è questo il momento in cui nella pratica clinica si iniziano ad indagare, come parte degli accertamenti di routine, gli esami ematochimici necessari ad individuare i pazienti sensibilizzati e con ABPA.

Sono stati proposti diversi fattori di rischio per lo sviluppo di colonizzazione da *A. fumigatus* e l'eventuale evoluzione a sensibilizzazione e ABPA: tra questi compare il genere femminile, tuttavia nella nostra limitata casistica è presente una prevalenza del sesso maschile tra i pazienti con ABPA mentre, per quanto riguarda tutti gli altri gruppi, compreso il gruppo dei sensibilizzati, la distribuzione tra genere maschile e femminile risulta omogenea¹⁶⁹.

Per quanto riguarda la correlazione tra alcune patologie intercorrenti e rischio di sviluppare colonizzazione da *A.fumigatus*, ed eventualmente l'evoluzione ad ABPA, nel campione in esame si è riscontrato che l'insufficienza pancreatica ha

una frequenza maggiore nei pazienti che presentano le condizioni dovute all'esposizione al fungo (ABPA, sensibilizzazione, Bronchite aspergillare, colonizzazione), ciò è in linea con quanto riportato in letteratura. Va comunque sottolineata la scarsità di studi in merito e come sia possibile che la maggior frequenza di insufficienza pancreatica in questi pazienti sia dovuta a una più grave disfunzione di CFTR, che esporrebbe anche i pazienti a più frequenti colonizzazioni da *A. fumigatus*¹⁵⁵.

La popolazione arruolata in questo lavoro è una popolazione giovane (età media 15,69 anni $\pm 3,99$), con una buona funzionalità respiratoria come evidenziato dai valori di FEV1 % del predetto (FEV1% medio 95,29 $\pm$ 13,28), in particolare i pazienti con ABPA in questa indagine hanno un FEV1% medio del 100,01% (DS1,08), che risulta superiore rispetto al FEV1% dei pazienti che non manifestano la complicanza. Tuttavia i soggetti con ABPA presentano un lieve declino del FEV1% nel triennio in esame (-0,88%), al contrario dei pazienti appartenenti agli altri gruppi che mostrano un recupero del FEV1% (sensibilizzati e Bronchite aspergillare) o comunque un minor declino (colonizzati e non segni di AF). Questo aspetto appare concorde con le più moderne evidenze¹⁶⁹ che stanno mettendo in discussione la più comune convinzione che l'ABPA abbia un grande impatto sulla funzionalità polmonare anche al netto degli altri fattori prognostici negativi (basso BMI, genotipi ad alto rischio, genere femminile, diabete associato alla FC, colonizzazione da *P. aeruginosa*)¹⁷⁰.

È necessario sottolineare inoltre che l'effetto dell'ABPA sulla funzione polmonare e sul declino della stessa sia verosimilmente dipendente dalla fase di malattia in cui si trova il paziente, entrambi i pazienti analizzati in questo lavoro si trovavano nella fase 2 (fase di remissione) al momento dell'arruolamento. Questo può aver contribuito al mantenimento degli ottimi livelli di FEV1% riscontrati. Il buon andamento dei pazienti con ABPA nel 2021 viene confermato anche dalla ridotta necessità di intraprendere cicli antibiotici per via orale (0,04 cicli/mese), inoltre questi pazienti nel 2021 non hanno eseguito alcun ciclo di terapia steroidea né orale né endovenosa.

I pazienti sensibilizzati nel periodo in esame hanno visto aumentare il loro FEV1% medio (+3,49%) e ciò si pone in controtendenza con quanto dichiarato dalla letteratura¹⁷¹, tuttavia questo aspetto nella popolazione indagata potrebbe

essere legato all'introduzione di farmaci modulatori nel piano terapeutico di alcuni pazienti.

Nella letteratura è stata studiata la complessità del microbiota caratterizzante le vie aeree dei pazienti con Fibrosi Cistica sottolineando come sia identificabile una correlazione positiva tra la colonizzazione da *A. fumigatus* e le colonizzazioni da *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*, mentre la colonizzazione da *B. cepacia complex* sia correlata negativamente sia con la colonizzazione concomitante che futura da *A. fumigatus*¹⁷².

Il campione esaminato in questo lavoro fornisce dati in linea con la letteratura per quanto riguarda la colonizzazione da *P. aeruginosa* nei pazienti affetti da patologie correlate alla presenza di *A. fumigatus*, mentre non è possibile identificare alcuna correlazione con *B. Cepacia complex* poiché non risulta come colonizzante nella popolazione indagata.

Uno studio svolto su dati provenienti dal Registro FC irlandese identifica la co-infezione da *A. fumigatus* e *P. aeruginosa* come fattore di rischio per un peggior outcome clinico con un aumentato numero di esacerbazioni e ricoveri ospedalieri¹⁷³.

Nonostante sia chiara la correlazione tra le infezioni da *A. fumigatus* e *P. aeruginosa*, non c'è accordo sui meccanismi biologici alla base di tale aspetto, e sul rapporto temporale che intercorre tra tali infezioni, ovvero se l'infezione da *P. aeruginosa* possa precedere e promuovere l'infezione fungina. Esistono studi su animali che mostrano un'attività inibente la crescita fungina da parte del biofilm creato da *P. aeruginosa*, che alludono alla possibilità che un'infezione attiva possa prevenire la germinazione delle spore fungine e di conseguenza l'infezione^{174,175}.

Altri studi, sempre su animali, sembrano invece mostrare che *Aspergillus spp* prosperi nel microambiente costituito dal biofilm creato da *Pseudomonas aeruginosa* e teorizzano che la germinazione all'interno di queste strutture permetta alle spore fungine di evadere la risposta infiammatoria dell'ospite¹⁷⁶.

È stato teorizzato inoltre che la causa della correlazione tra l'infezione da *P. aeruginosa* e *A. fumigatus* possa risiedere nel maggior uso di antibiotici inalatori da parte dei pazienti colonizzati da *P. aeruginosa*, in quanto questo tipo di trattamento potrebbe ridurre la competizione all'interno delle vie aeree dei pazienti con FC permettendo al fungo di prosperare^{177,178}.

Nella popolazione analizzata non è stata trovata una differenza rilevante tra le categorie con patologie aspergillari e coloro che non presentano segni di AF per quanto riguarda l'uso di antibiotici inalatori.

L'effetto a lungo termine delle infezioni fungine e i fattori di rischio per lo sviluppo di queste non sono stati chiariti e saranno necessari studi approfonditi su coorti molto ampie. Ulteriori indagini saranno utili per comprendere se l'infezione da *A. fumigatus* e le patologie ad essa correlate. Andrà indagato se hanno un ruolo causale nella progressione della malattia, se agiscono in modo sinergico con altri patogeni per aumentare la morbilità o se sono patologie associate all'interno di un contesto di malattia progressiva¹⁷⁹.

I farmaci modulatori stanno cambiando molte caratteristiche dei pazienti con FC, tra queste anche la quantità di escreato prodotta. Al momento attuale la coltura dell'escreato rimane il metodo di scelta per identificare le infezioni fungine e ciò rende difficoltoso comprendere l'impatto dei modulatori sulla prevalenza dell'infezione da *A. fumigatus*. In futuro sarà necessario sviluppare nuovi biomarkers per identificare la presenza di infezione fungina, e dunque delle patologie ad essa correlate, nei sempre più numerosi pazienti che giovano della terapia con modulatori¹⁷⁹.

In letteratura, al momento della stesura di questo lavoro, esistono pochi studi che analizzino l'effetto dei modulatori sulla colonizzazione da AF, tuttavia Frost et al. nel 2019 hanno elaborato dati estrapolati dal UK FC Registry che hanno mostrato come l'uso a lungo termine di Ivacaftor si associ a una riduzione di infezione da *P. aeruginosa* e *A. fumigatus*. Gli autori propongono come possibili meccanismi alla base di questo risultato: l'innata proprietà antimicrobica del farmaco, che tuttavia studi in vitro riferiscono sia prevalentemente rivolta verso batteri Gram-positivi, il miglioramento della clearance mucociliare dovuta al ripristino di parte della funzione di CFTR e la conseguente modifica del microambiente¹⁸¹.

Nello svolgimento di questo lavoro sono stati riscontrati alcuni limiti, quali: la numerosità limitata del campione, il breve intervallo temporale considerato e la parziale incompletezza dei dati raccolti a causa di difficoltà legate alla pandemia da COVID-19 che ha interessato una porzione considerevole del periodo preso in esame.

In conclusione proprio la bassa numerosità campionaria non ci ha permesso di svolgere una analisi statistica, ma è stato un lavoro fondamentale per classificare i

pazienti e cominciare a valutare i vari fattori di rischio associati alle patologie aspergillari.

Questo lavoro va dunque considerato come studio pilota che dovrà proseguire il follow up dei pazienti già considerati e andrà ampliato e proposto come studio multicentrico per poter avere dati provenienti da casistiche più numerose.

6. CONCLUSIONI

Questo lavoro si è posto l'obiettivo di classificare i pazienti con Fibrosi Cistica e le varie forme di Aspergillosi in una popolazione prevalentemente di età pediatrica.

I dati epidemiologici di prevalenza delle condizioni esaminate sono risultati in linea con la letteratura, in particolare si può notare come l'ABPA si sviluppi in età più adulta mentre le altre categorie sembrano essere associate ad un'età più precoce.

Per quanto riguarda le patologie concomitanti la presenza di insufficienza pancreatica è stata rilevata in tutti i pazienti appartenenti alle categorie che mostrano segni di Aspergillosi, mentre nei soggetti senza segni di AF la prevalenza è del 65%, questo aspetto è in linea con la letteratura e suggerisce che si possa trattarsi di un possibile fattore di rischio.

L'andamento funzionale respiratorio riscontrato nella nostra analisi evidenzia una lieve curva peggiorativa nell'andamento del FEV1 nei pazienti con ABPA, ma i nostri dati possono essere inficiati dalla scarsa numerosità del campione, dal breve follow up e dal confondimento dato dall'introduzione dei modulatori nelle varie classi di pazienti considerati.

Nell'analizzare le colonizzazioni polmonari abbiamo potuto rilevare una maggiore presenza di *P. aeruginosa* nel gruppo con ABPA e nei gruppi di pazienti che presentano segni di Aspergillosi rispetto ai pazienti che non presentano segni di AF, questo elemento potrebbe perciò rappresentare un fattore di rischio come suggerito anche dalla letteratura.

Nella popolazione in esame non sono presenti differenze rilevanti tra i gruppi, sia con segni di Aspergillosi che non, per quanto riguarda l'uso di antibiotici inalatori.

I maggiori limiti di questo studio sono: la scarsa numerosità campionaria che non ha permesso di fare un'analisi statistica significativa, e il breve intervallo temporale di osservazione dei pazienti.

Si tratta comunque di uno studio pilota che pone le basi per un futuro studio multicentrico.

Sarà interessante inoltre valutare l'impatto dei farmaci modulatori su questa complicanza della patologia polmonare in Fibrosi Cistica.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Kumar V., De Rosa G., Eusebi V., Aster JC., Abbas AK., Cotran RS., et al. Robbins e Cotran. Le basi patologiche delle malattie. Vol. 2. Milano: Edra; 2015. Pp 457-462.
2. Elborn JS. Cystic Fibrosis. Lancet. 2016;388:2519-2531.
3. Longo D., Fauci A., Kasper D., Hauser S., Jameson L., Loscalzo J. Harrison. Principi di Medicina Interna. Rozzano: Edra; ed 19^a. Pp 2265-2268.
4. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic fibrosis: Terminology and diagnostic algorithms. Thorax. 2006;61(7):627-635.
5. Boyle, M. P. (2003). *Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 9(6), 498–503.
6. Farrell, P. M., White, T. B., Ren, C. L., Hempstead, S. E., Accurso, F., Derichs, N., Sosnay, P. R. (2017). *Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. The Journal of Pediatrics*, 181, S4–S15.e1.
7. Simmonds, N. J. (2019). *Is it Cystic Fibrosis? The challenges of diagnosing cystic fibrosis. Paediatric Respiratory Reviews*.
8. Borowitz, D., Parad, R. B., Sharp, J. K., Sabadosa, K. A., Robinson, K. A., Rock, M. J., Accurso, F. J. (2009). *Cystic Fibrosis Foundation Practice Guidelines for the Management of Infants with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Metabolic Syndrome during the First Two Years of Life and Beyond. The Journal of Pediatrics*, 155(6), S106–S116.
9. Pagin, A., Sermet-Gaudelus, I., & Burgel, P.-R. (2020). *Genetic diagnosis in practice: From cystic fibrosis to CFTR-related disorders. Archives de Pédiatrie*, 27, eS25–eS29.
10. Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., Campbell, P. W. (2008). *Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. The Journal of Pediatrics*, 153(2), S4–S14.
11. Castellani, C., Massie, J., Sontag, M., & Southern, K. W. (2016). *Newborn screening for cystic fibrosis. The Lancet Respiratory Medicine*, 4(8), 653–661.
12. O’Sullivan, B. P., & Freedman, S. D. (2009). *Cystic fibrosis. The Lancet*, 373(9678), 1891–1904.

13. Savant, A. P., & McColley, S. A. (2019). *Cystic fibrosis year in review 2018, part 1. Pediatric Pulmonology*.
14. Amato A., Campagna G., Majo F., Ferrari G., Quattrucci S., Carnovale V., Padoan R., Floridia G., Puppo Fornaro G., Salvatore D., Taruscio D., Salvatore M. Registro italiano Fibrosi Cistica (RIFC). Rapporto 2020.
15. Giordani B, Amato A, Majo F, Ferrari G, Quattrucci S, Minicucci L, et al., curatori. Registro italiano Fibrosi Cistica (RIFC). Rapporto 2015-2016. *Epidemiol Prev.* agosto 2019;43(4S1):1–36.
16. Cohn, J. A., Neoptolemos, J. P., Feng, J., Yan, J., Jiang, Z., Greenhalf, W., ... Sommer, S. S. (2005). *Increased risk of idiopathic chronic pancreatitis in cystic fibrosis carriers. Human Mutation*, 26(4), 303–307.
17. Wang, X., Kim, J., McWilliams, R., & Cutting, G. R. (2005). *Increased Prevalence of Chronic Rhinosinusitis in Carriers of a Cystic Fibrosis Mutation. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 131(3), 237.
18. Kerem, B., Rommens, J., Buchanan, J., Markiewicz, D., Cox, T., Chakravarti, A., Tsui, L. (1989). *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science*, 245(4922), 1073–1080.
19. Boyle, M. P., & De Boeck, K. (2013). *A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. The Lancet Respiratory Medicine*, 1(2), 158–163.
20. D Abeliovich, I P Lavon, I Lerer, T Cohen, C Springer, A Avital, and G R Cutting. Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis (CF) chromosomes and predicts a carrier frequency of 1:29 in the Jewish Ashkenazi population. Novembre 1992; 51(5):951-6.
21. Rendine, S., Calafell, F., Cappello, N., Gagliardini, R., Caramia, G., Rigillo, N., Battistini, F. (1997). *Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. Annals of Human Genetics*, 61(5), 411–424.
22. Hudock, K. M., & Clancy, J. P. (2017). *An update on new and emerging therapies for cystic fibrosis. Expert Opinion on Emerging Drugs*, 22(4), 331–346.
23. Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M., Cassiman, J. J., Kerem, E., Durie, P., Elborn, J. S. (2008). *Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. Journal of Cystic Fibrosis*, 7(3), 179–196.
24. Fajac, I., & De Boeck, K. (2017). New horizons for cystic fibrosis treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 170, 205–211.

-
25. De Boeck, K. (2020). Cystic fibrosis in the year 2020: a disease with a new face. *Acta Paediatrica*.
 26. Buranawuti, K., Boyle, M. P., Cheng, S., Steiner, L. L., McDougal, K., Fallin, M. D., Cutting, G. R. (2006). *Variants in mannose-binding lectin and tumour necrosis factor affect survival in cystic fibrosis. Journal of Medical Genetics, 44(3), 209–214.*
 27. Sagwal, S., Chauhan, A., Kaur, J., Prasad, R., Singh, M., & Singh, M. (2020). *Association of Serum TGF- β 1 Levels with Different Clinical Phenotypes of Cystic Fibrosis Exacerbation. Lung.*
 28. Cutting, G. R. (2014). Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews Genetics, 16(1), 45–56.*
 29. Swahn, H., Sabith Ebron, J., Lamar, K., Yin, S., Kerschner, J. L., NandyMazumdar, M., Harris, A. (2019). *Coordinate regulation of ELF5 and EHF at the chr11p13 CF modifier region. Journal of Cellular and Molecular Medicine.*
 30. Bareil, C., & Bergougnoux, A. (2020). *CFTR gene variants, epidemiology and molecular pathology. Archives de Pédiatrie, 27, eS8–eS12.*
 31. Lopes-Pacheco M. (2020) CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine.
 32. Rowe, S. M., Miller, S., & Sorscher, E. J. (2005). *Cystic Fibrosis. New England Journal of Medicine, 352(19), 1992–2001.*
 33. Meng, X., Clews, J., Kargas, V., Wang, X., & Ford, R. C. (2016). *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and its stability. Cellular and Molecular Life Sciences, 74(1), 23–38.*
 34. Gadsby, D. C., Vergani, P., & Csanády, L. (2006). *The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. Nature, 440(7083), 477–483.*
 35. Ratjen, F., Bell, S. C., Rowe, S. M., Goss, C. H., Quittner, A. L., & Bush, A. (2015). *Cystic fibrosis. Nature Reviews Disease Primers, 15010.*
 36. Trezise A. Exquisite and multilevel regulation of CFTR expression. In: Bush A, Alton EFW, Davies JC, Griesenbach U JA, ed. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. S. Karger; 2005:11-20.
 37. Clunes, M. T., & Boucher, R. C. (2007). *Cystic fibrosis: the mechanisms of pathogenesis of an inherited lung disorder. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 4(2), 63–72.*

38. Gentzsch, M., Dang, H., Dang, Y., Garcia-Caballero, A., Suchindran, H., Boucher, R. C., & Stutts, M. J. (2010). The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Impedes Proteolytic Stimulation of the Epithelial Na⁺Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32227–32232.
39. Hobbs, C. A., Da Tan, C., & Tarran, R. (2013). *Does epithelial sodium channel hyperactivity contribute to cystic fibrosis lung disease? The Journal of Physiology*, 591(18), 4377–4387.
40. Kiedrowski, M. R., & Bomberger, J. M. (2018). *Viral-Bacterial Co-infections in the Cystic Fibrosis Respiratory Tract. Frontiers in Immunology*, 9.
41. Cantin, A. M., Hartl, D., Konstan, M. W., & Chmiel, J. F. (2015). *Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. Journal of Cystic Fibrosis*, 14(4), 419–430.
42. Turcios, N. L. (2019). *Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview. Respiratory Care*, respcare.06697.
43. Ooi, C. Y., & Durie, P. R. (2012). *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in pancreatitis. Journal of Cystic Fibrosis*, 11(5), 355–362.
44. Kamal, N., Surana, P., & Koh, C. (2018). *Liver disease in patients with cystic fibrosis. Current Opinion in Gastroenterology*, 1.
45. Von Eckardstein, S., Cooper, T. G., Rutscha, K., Meschede, D., Horst, J., & Nieschlag, E. (2000). *Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. Fertility and Sterility*, 73(6), 1226–1231.
46. Servidoni, M. F., Gomez, C. C. S., Marson, F. A. L., Toro, A. A. D. C., Ribeiro, M. Â. G. de O., Ribeiro, J. D., & Ribeiro, A. F. (2017). Sweat test and cystic fibrosis: overview of test performance at public and private centers in the state of São Paulo, Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 43(2), 121–128.
47. Castellani, C., & Massie, J. (2013). *Newborn screening and carrier screening for cystic fibrosis: alternative or complementary? European Respiratory Journal*, 43(1), 20–23.
48. Castellani, C. (2009). *Association Between Carrier Screening and Incidence of Cystic Fibrosis. JAMA*, 302(23), 2573.
49. Procianoy, E. da F. A., de Abreu e Silva, F. A., Maróstica, P. J. C., & Quinton, P. M. (2019). *Chloride Conductance, Nasal Potential Difference and Cystic Fibrosis Pathophysiology. Lung*.

-
50. Tridello, G., Menin, L., Pintani, E., Bergamini, G., Assael, B. M., & Melotti, P. (2016). *Nasal potential difference outcomes support diagnostic decisions in cystic fibrosis*. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15(5), 579–582.
 51. Daftary, A., Acton, J., Heubi, J., & Amin, R. (2006). *Fecal elastase-1: Utility in pancreatic function in cystic fibrosis*. *Journal of Cystic Fibrosis*, 5(2), 71–76.
 52. Walkowiak, J., Glapa, A., Nowak, J. K., Bober, L., Rohovyk, N., Wenska-Chyży, E., Lisowska, A. (2016). *Pancreatic Elastase-1 Quick Test for rapid assessment of pancreatic status in cystic fibrosis patients*. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15(5), 664–668.
 53. Nelson L Turcios: *Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview*; Respiratory Care February 2020, 65 (2) 233-251.
 54. Lombardi, E., Gambazza, S., Pradal, U., & Braggion, C. (2019). *Lung clearance index in subjects with cystic fibrosis in Italy*. *Italian Journal of Pediatrics*, 45(1).
 55. Kent, L., Reix, P., Innes, J. A., Zielen, S., Le Bourgeois, M., Braggion, C., De Boeck, K. (2014). *Lung clearance index: Evidence for use in clinical trials in cystic fibrosis*. *Journal of Cystic Fibrosis*, 13(2), 123–138.
 56. Subbarao, P., Stanojevic, S., Brown, M., Jensen, R., Rosenfeld, M., Davis, S., Ratjen, F. (2013). *Lung Clearance Index as an Outcome Measure for Clinical Trials in Young Children with Cystic Fibrosis. A Pilot Study Using Inhaled Hypertonic Saline*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(4), 456–460.
 57. Subbarao, P., Milla, C., Aurora, P., Davies, J. C., Davis, S. D., Hall, G. L., Morgan, W. (2015). *Multiple-Breath Washout as a Lung Function Test in Cystic Fibrosis. A Cystic Fibrosis Foundation Workshop Report*. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(6), 932–939.
 58. Horsley, A. (2009). *Lung clearance index in the assessment of airways disease*. *Respiratory Medicine*, 103(6), 793–799.
 59. Braggion, C., Piacentini, G., Boner, A.L. Fibrosi cistica. In: Edra, ed. Rugarli. Medicina Interna Sistemica. Vol 1. ; 2017:482-490.
 60. Anstead, M., Saiman, L., Mayer-Hamblett, N., Lands, L. C., Kloster, M., Goss, C. H., Ratjen, F. (2014). *Pulmonary exacerbations in CF patients with early lung disease*. *Journal of Cystic Fibrosis*, 13(1), 74–79.
 61. Goss, C. H. (2019). *Acute Pulmonary Exacerbations in Cystic Fibrosis. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*.

62. Kang, S. H., Dalcin, P. de T. R., Piltcher, O. B., & Migliavacca, R. de O. (2015). *Chronic rhinosinusitis and nasal polyposis in cystic fibrosis: update on diagnosis and treatment. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 41(1), 65–76.*
63. Woods, J. D., Payton, K. S. E., Sanchez-Lara, P. A., Au, M., Simmons, C. F., & Graham, J. M. (2019). *Non-Cystic Fibrosis-Related Meconium Ileus: GUCY2C Associated Disease Discovered through Rapid Neonatal Whole-Exome Sequencing. The Journal of Pediatrics.*
64. Sathe, M., & Houwen, R. (2017). *Meconium ileus in Cystic Fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis, 16, S32–S39.*
65. Nirzar S. Parikh; Sherif Ibrahim; Rajni Ahlawat. Meconium ileus, In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020
66. Canny, J., Brookes, A., & Bowley, D. (2017). *Distal intestinal obstruction syndrome and colonic pathologies in cystic fibrosis. British Journal of Hospital Medicine, 78(1), 38–43.*
67. Bertolaso, C., Groleau, V., Schall, J. I., Maqbool, A., Mascarenhas, M., Latham, N. E., Stallings, V. A. (2014). *Fat-Soluble Vitamins in Cystic Fibrosis and Pancreatic Insufficiency. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 58(4), 443–448.*
68. El-Chammas, K. I., Rumman, N., Goh, V. L., Quintero, D., & Goday, P. S. (2015). *Rectal Prolapse and Cystic Fibrosis. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 60(1), 110–112.*
69. Kamal, N., Surana, P., & Koh, C. (2018). *Liver disease in patients with cystic fibrosis. Current Opinion in Gastroenterology, 1.*
70. Kamal, N., Surana, P., & Koh, C. (2018). *Liver disease in patients with cystic fibrosis. Current Opinion in Gastroenterology, 1.*
71. Singh, V. K., & Schwarzenberg, S. J. (2017). *Pancreatic insufficiency in Cystic Fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis, 16, S70–S78.*
72. De Boeck, K., Weren, M., Proesmans, M., & Kerem, E. (2005). *Pancreatitis Among Patients with Cystic Fibrosis: Correlation With Pancreatic Status and Genotype. PEDIATRICS, 115(4), e463–e469.*
73. Freeman, A. J., & Ooi, C. Y. (2017). *Pancreatitis and pancreatic cystosis in Cystic Fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis, 16, S79–S86.*
74. Granados, A., Chan, C. L., Ode, K. L., Moheet, A., Moran, A., & Holl, R. (2019). *Cystic fibrosis related diabetes: Pathophysiology, screening and diagnosis. Journal of Cystic Fibrosis, 18, S3–S9.*

-
75. Boas, S., Falsetti, D., Murphy, t., & Orenstein, D. (1995). Validity of self-assessment of sexual maturation in adolescent male patients with cystic fibrosis. *Journal of Adolescent Health*, 17(1), 42–45.
 76. Ahmad, A., Ahmed, A., & Patrizio, P. (2013). *Cystic fibrosis and fertility. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 25(3), 167–172.
 77. Hugan, K. S., Daley, T., Rayas, M. S., Kelly, A., & Roe, A. (2019). *Female reproductive health in cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis*, 18, S95–S104.
 78. Boyd, J. M., Mehta, A., & Murphy, D. J. (2004). *Fertility and pregnancy outcomes in men and women with cystic fibrosis in the United Kingdom. Human Reproduction*, 19(10), 2238–2243.
 79. Frayman, K. B., Kazmerski, T. M., & Sawyer, S. M. (2017). *A systematic review of the prevalence and impact of urinary incontinence in cystic fibrosis. Respiriology*, 23(1), 46–54.
 80. Neemuchwala, F., Ahmed, F., & Nasr, S. Z. (2017). *Prevalence of Pelvic Incontinence in Patients with Cystic Fibrosis. Global Pediatric Health*, 4, 2333794X1774342.
 81. Gauthier, S., Pranke, I., Jung, V., Martignetti, L., Stoven, V., Nguyen-Khoa, T., Sermet-Gaudelus, I. (2020). *Urinary Exosomes of Patients with Cystic Fibrosis Unravel CFTR-Related Renal Disease. International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6625.
 82. Harutyunyan, M., Huang, Y., Mun, K.-S., Yang, F., Arora, K., & Naren, A. P. (2018). Personalized medicine in CF: from modulator development to therapy for cystic fibrosis patients with rare CFTR mutations. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(4), L529–L543.
 83. Marquette, M., & Haworth, C. S. (2016). *Bone health and disease in cystic fibrosis. Paediatric Respiratory Reviews*, 20, 2–5.
 84. Calella, P., Valerio, G., Brodlie, M., Donini, L. M., & Siervo, M. (2018). *Cystic fibrosis, body composition, and health outcomes: a systematic review. Nutrition*, 55-56, 131–139.
 85. Takemoto, C. M. (2011). *Venous thromboembolism in cystic fibrosis. Pediatric Pulmonology*, 47(2), 105–112.
 86. Raffini, L. J., Raybagkar, D., Blumenstein, M. S., Rubenstein, R. C., & Manno, C. S. (2006). *Cystic fibrosis as a risk factor for recurrent venous thrombosis at a pediatric tertiary care hospital. The Journal of Pediatrics*, 148(5), 659–664.

-
87. Branchford, B. R., & Carpenter, S. L. (2018). *The Role of Inflammation in Venous Thromboembolism. Frontiers in Pediatrics*, 6.
 88. Havermans, T., & Willem, L. (2019). *Prevention of anxiety and depression in cystic fibrosis. Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 25(6), 654–659.
 89. Konstan, M. W., & Ratjen, F. (2012). *Effect of dornase alfa on inflammation and lung function: Potential role in the early treatment of cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis*, 11(2), 78–83.
 90. Gilbert D., Chambers H., Helopoulos G., Saag M., Pavia A., *The Sanford guide to antimicrobial Therapy 2019*, 49 ed, Sanford Guide; 2019
 91. Edmondson, C., & Davies, J. C. (2016). *Current and future treatment options for cystic fibrosis lung disease: latest evidence and clinical implications. Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 7(3), 170–183.
 92. VanDevanter, D. R., Craib, M. L., Pasta, D. J., Millar, S. J., Morgan, W. J., Konstan, M. W. (2017). *Cystic fibrosis clinical characteristics associated with dornase alfa treatment regimen change. Pediatric Pulmonology*, 53(1), 43–49.
 93. Chmiel, J. F., Aksamit, T. R., Chotirmall, S. H., Dasenbrook, E. C., Elborn, J. S., LiPuma, J. J., ... Ratjen, F. A. (2014). *Antibiotic Management of Lung Infections in Cystic Fibrosis. I. The Microbiome, Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Gram-Negative Bacteria, and Multiple Infections. Annals of the American Thoracic Society*, 11(7), 1120–1129.
 94. Waters, V., & Smyth, A. (2015). *Cystic fibrosis microbiology: Advances in antimicrobial therapy. Journal of Cystic Fibrosis*, 14(5), 551–560.
 95. Elson, E. C., Mermis, J., Polineni, D., & Oermann, C. M. (2019). *Aztreonam Lysine Inhalation Solution in Cystic Fibrosis. Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*, 13, 117954841984282.
 96. Muhlebach, M. S. (2017). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in cystic fibrosis. Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 23(6), 544–550.
 97. Dezube, R., Jennings, M. T., Rykiel, M., Diener-West, M., Boyle, M. P., Chmiel, J. F., & Dasenbrook, E. C. (2018). *Eradication of persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis*.
 98. Heltshe, S. L., Saiman, L., Popowitch, E. B., Miller, M. B., Kloster, M., Thompson, V. Muhlebach, M. S. (2014). *Outcomes and Treatment of Chronic Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Differs by Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Type in Children*

With Cystic Fibrosis. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society, 4(3), 225–231.

99. Somayaji, R., Yau, Y. C. W., Tullis, E., LiPuma, J. J., Ratjen, F., & Waters (2020). *Clinical Outcomes Associated with Burkholderia cepacia Complex Infection in Patients with Cystic Fibrosis. Annals of the American Thoracic Society.*
100. Richards, C. J., & Olivier, K. N. (2019). Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine.*
101. King, J., Brunel, S. F., & Warris, A. (2016). *Aspergillus infections in cystic fibrosis. Journal of Infection, 72, S50–S55.*
102. Grillo, L., Rand, S., & Main, E. (2015). *Airway Clearance Strategies in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 36(02), 251–266.*
103. Cresta F., Naselli A., Favilli F., Casciaro R., Inhaled Hypertonic saline + hyaluronic acid in cystic fibrosis with asthma-like symptoms: a new therapeutic chance. *BMJ Case Rep.* 29 aprile 2013;2013
104. Flume, P. A., Aitken, M. L., Bilton, D., Agent, P., Charlton, B., Forster, E., Button, B. M. (2015). *Optimising inhaled mannitol for cystic fibrosis in an adult population. Breathe, 11(1), 39–48.*
105. Ratjen, F., Durham, T., Navratil, T., Schaberg, A., Accurso, F. J., Wainwright, C., ... Moss, R. B. (2012). *Long term effects of denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis, 11(6), 539–549.*
106. Balfour-LynnIM, Lees B, Hall P, Phillips G, Khan M, Flather M, et al. Multicenter randomized controlled trial of withdrawal of inhaled corticosteroids in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.*
107. Konstan, M. W., Döring, G., Heltshe, S. L., Lands, L. C., Hilliard, K. A., Koker, P., Hamilton, A. (2014). *A randomized double blind, placebo-controlled phase 2 trial of BIIL 284 BS (an LTB4 receptor antagonist) for the treatment of lung disease in children and adults with cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis, 13(2), 148–155.*
108. Li, L., & Somerset, S. (2016). Dietary intake and nutritional status of micronutrients in adults with cystic fibrosis in relation to current recommendations. *Clinical Nutrition, 35(4), 775–782.*
109. Cystic Fibrosis Foundation (CFF). 2019 Patient Registry: Annual Data Report. *Cyst Fibros Found Patient Regist.* 2019
110. McIlwaine, M. P., Alarie, N., Davidson, G. F., Lands, L. C., Ratjen, F., Milner, R., Agnew, J. L. (2013). *Long-term multicentre randomised controlled study of high frequency chest wall oscillation versus positive*

-
- expiratory pressure mask in cystic fibrosis. Thorax, 68(8), 746–751.*
111. Nixon, P. A., Orenstein, D. M., Kelsey, S. F., & Doershuk, C. F. (1992). *The Prognostic Value of Exercise Testing in Patients with Cystic Fibrosis. New England Journal of Medicine, 327(25), 1785–1788.*
 112. Caronia, C. G., Gorvoy, J., Silver, P., Quinn, C., Nimkoff, L., & Sagy, M. (1998). *Use of Bilevel Positive Airway Pressure (BIPAP) in End-Stage Patients with Cystic Fibrosis Awaiting Lung Transplantation. Clinical Pediatrics, 37(9), 555–559.*
 113. Rand, S., Hill, L., & Prasad, S. A. (2013). *Physiotherapy in cystic fibrosis: optimising techniques to improve outcomes. Paediatric Respiratory Reviews, 14(4), 263–269.*
 114. Ode, K. L., Chan, C. L., Granados, A., Moheet, A., Moran, A., & Brennan, A. L. (2019). *Cystic fibrosis related diabetes: Medical management. Journal of Cystic Fibrosis, 18, S10–S18.*
 115. Ramos KJ, Smith PJ, McKone EF, Pilewski JM, Lucy A, Hempstead SE, Tallarico E, Faro A, Rosenbluth DB, Gray AL, Dunitz JM; Lung transplant referral for individuals with cystic fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation consensus guidelines. CF Lung Transplant Referral Guidelines Committee. *J Cyst Fibros.* 2019 May;18(3):321-333.
 116. Stephenson, A. L., Stanojevic, S., Sykes, J., & Burgel, P.-R. (2017). *The changing epidemiology and demography of cystic fibrosis. La Presse Médicale, 46(6), e87–e95.*
 117. Rapporto 2020 - http://www.trapianti.salute.gov.it/imgs/C_17_cntPubblicazioni_415_allegato.pdf
 118. Konstan, M. W., VanDevanter, D. R., Rowe, S. M., Wilschanski, M., Kerem, E., Sermet-Gaudelus, I., De Boeck, K. (2020). *Efficacy and safety of ataluren in patients with nonsense-mutation cystic fibrosis not receiving chronic inhaled aminoglycosides: The international, randomized, double-blind, placebo-controlled Ataluren Confirmatory Trial in Cystic Fibrosis (ACT CF). Journal of Cystic Fibrosis.*
 119. Zainal Abidin, N., Haq, I. J., Gardner, A. I., & Brodlie, M. (2017). *Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? Expert Opinion on Pharmacotherapy, 18(13), 1363–1371.*
 120. Lai, H. J. (2004). *Association between Initial Disease Presentation, Lung Disease Outcomes, and Survival in Patients with Cystic Fibrosis. American Journal of Epidemiology, 159(6), 537–546.*
 121. McCarthy C, O'Carroll O, Franciosi A, McElvaney N. *Factors Affecting Prognosis And Predicting Outcome in Cystic Fibrosis Lung Disease in:*

Cystic Fibrosis in the Light of New Research. IntechOpen, 2015

122. Kuk, K., & Taylor-Cousar, J. L. (2015). *Lumacaftor and ivacaftor in the management of patients with cystic fibrosis: current evidence and future prospects. Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 9(6), 313–326.
123. Milla, C. E., Ratjen, F., Marigowda, G., Liu, F., Waltz, D., & Rosenfeld, M. (2017). Lumacaftor/Ivacaftor in Patients Aged 6–11 Years with Cystic Fibrosis and Homozygous for F508del-CFTR. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(7), 912–920.
124. Ratjen, F., Hug, C., Marigowda, G., Tian, S., Huang, X., Stanojevic, S., Davies, J. C. (2017). *Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6–11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebocontrolled phase 3 trial. The Lancet Respiratory Medicine*, 5(7), 557–567.
125. Hoppe JE, Chilvers M, Ratjen F, McNamara JJ, Owen CA, Tian S, Zahigian R, Cornell AG, McColley SA. Long-term safety of lumacaftor-ivacaftor in children aged 2-5 years with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation:a multicentre, phase 3, open-label, extension study *Lancet Respir Med*. 2021 May 6:S2213-2600(21)00069-2.
126. Rowe, S. M., Daines, C., Ringshausen, F. C., Kerem, E., Wilson, J., Tullis, E., ... Davies, J. C. (2017). *Tezacaftor–Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. New England Journal of Medicine*, 377(21), 2024–2035.
127. Davies, J. C., Cunningham, S., Harris, W. T., Lapey, A., Regelman, W. E., Sawicki, G. S., Rosenfeld, M. (2016). *Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2–5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study. The Lancet Respiratory Medicine*, 4(2), 107–115.
128. Rosenfeld, M., Wainwright, C. E., Higgins, M., Wang, L. T., McKee, C., Campbell, D., Robinson, P. (2018). *Ivacaftor treatment of cystic fibrosis in children aged 12 to <24 months and with a CFTR gating mutation (ARRIVAL): a phase 3 single-arm study. The Lancet Respiratory Medicine*, 6(7), 545–553.
129. Davies, J. C., Wainwright, C. E., Sawicki, G. S., Higgins, M. N., Campbell, D., Harris, C. (2020). *Ivacaftor in Infants Aged 4 to <12 Months with Cystic Fibrosis and a Gating Mutation: Results of a 2-Part Phase 3 Clinical Trial. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.
130. Schneider, E. K., McQuade, R. M., Carbone, V. C., Reyes-Ortega, F., Wilson, J. W., Button, B., Velkov, T. (2018). *The potentially beneficial central nervous system activity profile of ivacaftor and its metabolites.*

-
- ERJ* *Open* *Research,* *4(1),00127–2017.*
131. Wainwright, C. E., Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., ... Boyle, M. P. (2015). *Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR*. *New England Journal of Medicine*, 373(3), 220–231.
 132. Konstan, M. W., McKone, E. F., Moss, R. B., Marigowda, G., Tian, S., Waltz, D., Sawicki, G. S. (2017). Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 5(2), 107–118.
 133. Burgel, P.-R., Munck, A., Durieu, I., Chiron, R., Mely, L., ... Prevotat, A. (2019). *Real-Life Safety and Effectiveness of Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.
 134. Paterson, S. L., Barry, P. J., & Horsley, A. R. (2019). *Tezacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis*. *Expert Review of Respiratory Medicine*.
 135. Walker, S., Flume, P., McNamara, J., Solomon, M., Chilvers, M., Chmiel, J., Sawicki, G. (2019). *A phase 3 study of tezacaftor in combination with ivacaftor in children aged 6 through 11 years with cystic fibrosis*. *Journal of Cystic Fibrosis*.
 136. Davies, J. C., Sermet-Gaudelus, I., Naehrlich, L., Harris, R. S., Campbell, D., Ahluwalia, N., ... Wainwright, C. E. (2020). *A phase 3, double-blind, parallel-group study to evaluate the efficacy and safety of tezacaftor in combination with ivacaftor in participants 6 through 11 years of age with cystic fibrosis homozygous for F508del or heterozygous for the F508del-CFTR mutation and a residual function mutation*. *Journal of Cystic Fibrosis*.
 137. SYMDEKO (tezacaftor/ivacaftor) tablets. :15
 138. Merman E, Stanbrook MB, Anand A. VX-659–tezacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis and one or two Phe508del alleles. *Canadian Journal of Respiratory, Critical Care, and Sleep Medicine*. 2019;4(1):66–7.
 139. Middleton, P. G., Mall, M. A., Dřevínek, P., Lands, L. C., McKone, E. F., Polineni, D., Jain, R. (2019). Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *New England Journal of Medicine*.
 140. Heijerman, H. G. M., McKone, E. F., Downey, D. G., Van Braeckel, E., Rowe, S. M., Tullis, E., McKee, C. M. (2019). Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people

-
- with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*.
141. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04058353>
 142. C Martin, E Burnet, A Ronayette-Preira, P de Carli, J Martin, L Delmas, B. Prieur, P-R Burgel. Patient perspectives following initiation of elexacaftortezacaftor-ivacaftor in people with cystic fibrosis and advanced lung disease. *Respir Med Res* 2021 May 17; 80:100829.
 143. KAFTRIO, EMA, https://www.ema.europa.eu/en/documents/productinformation/kaftrio-epar-product-information_it.pdf
 144. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kaftrio-eparmedicine-overview_it.pdf
 145. Zemanick ET, Taylor-Cousar JL, Davies J, Gibson RL, Mall MA, McKone EF, McNally P, Ramsey BW, Rayment JH, Rowe SM, Tullis E, Ahluwalia N, Chu C, Ho T, Moskowitz SM, Noel S, Tian S, Waltz D, Weinstock TG, Xuan F, Wainwright CE, McColley SA; VX18-445-106 Study Group. *A Phase 3 Open-Label Study of ELX/TEZ/IVA in Children 6 Through 11 Years of Age With CF and at Least One F508del Allele* *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 Mar 18.
 146. Pedemonte, N., Bertozzi, F., Caci, E., Sorana, F., Di Fruscia, P., Tomati, V., Galletta, L. J. V. (2020). Discovery of a picomolar potency pharmacological corrector of the mutant CFTR chloride channel. *Science Advances*, 6(8), eaay9669.
 147. Bell, S. C., Mall, M. A., Gutierrez, H., Macek, M., Madge, S., Davies, J. C., Ratjen, F. (2019). The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *The Lancet Respiratory Medicine*.
 148. Knutsen AP, Slavin RG. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Cystic Fibrosis*. 1990;103–18.
 149. Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS, Francesco DP. micologia. In: *Microbiologia medica*. Milano, Italy: Edra; 2021. p. 686–8.
 150. Janahi IA, Rehman A, Al-Naimi AR. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Annals of Thoracic Medicine*. 2017;12(2):74.
 151. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;132(3).

-
152. Lattanzi C, Messina G, Fainardi V, Tripodi MC, Pisi G, Esposito S. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis: An update on the newest diagnostic tools and therapeutic approaches. *Pathogens*. 2020;9(9):716.
 153. Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: Systematic Review and meta-analysis. *Clinical & Experimental Allergy*. 2015;45(12):1765–78.
 154. Delfino E, Del Puente F, Briano F, Sepulcri C, Giacobbe DR. Respiratory fungal diseases in adult patients with cystic fibrosis. *Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*. 2019; 13:117954841984993.
 155. Hong G, Psoter KJ, Jennings MT, Merlo CA, Boyle MP, Hadjiliadis D, et al. Risk factors for persistent aspergillus respiratory isolation in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018;17(5):624–30.
 156. Jubin V, Ranque S, Stremler Le bel N, Sarles J, Dubus J-C. Risk factors for aspergillus colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*. 2010;45(8):764–71.
 157. Sunman B, Ademhan Tural D, Ozsezen B, Emiralioglu N, Yalcin E, Özçelik U. Current approach in the diagnosis and management of allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Frontiers in Pediatrics*. 2020;8.
 158. Maleki M, Mortezaee V, Hassanzad M, Mahdavian SA, Poorabdollah M, Mehrian P, et al. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis patients using two different diagnostic criteria. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;52(03):74.
 159. Lewington-Gower E, Chan L, Shah A. Review of current and future therapeutics in ABPA. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2021; 12:204062232110470.
 160. Agarwal R, Aggarwal AN, Dhooria S, Singh Sehgal I, Garg M, Saikia B, et al. A randomised trial of glucocorticoids in acute-stage allergic bronchopulmonary aspergillosis complicating asthma. *European Respiratory Journal*. 2015;47(2):490–8.
 161. Singh Sehgal I, Agarwal R. Pulse methylprednisolone in allergic bronchopulmonary aspergillosis exacerbations. *European Respiratory Review*. 2014;23(131):149–52.
 162. Periselneris J, Nwankwo L, Schelenz S, Shah A, Armstrong-James D. Posaconazole for the treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis

-
- in patients with cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;74(6):1701–3.
163. Ram B, Aggarwal AN, Dhooria S, Sehgal IS, Garg M, Behera D, et al. A pilot randomized trial of nebulized amphotericin in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Journal of Asthma*. 2016;53(5):517–24.
 164. Ha EVS, Rogers DF. Novel therapies to inhibit mucus synthesis and secretion in airway hypersecretory diseases. *Pharmacology*. 2015;97(1-2):84–100.
 165. Frost FJ, Nazareth DS, Charman SC, Winstanley C, Walshaw MJ. Ivacaftor is associated with reduced lung infection by key cystic fibrosis pathogens. A cohort study using National Registry data. *Annals of the American Thoracic Society*. 2019;16(11):1375–82.
 166. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Review of literature and proposal of New Diagnostic and Classification Criteria. *Clinical & Experimental Allergy*. 2013;43(8):850–73.
 167. Jones AM, Horsley A, Denning DW. What is the importance of classifying *aspergillus* disease in cystic fibrosis patients? *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2014;8(4):389–92.
 168. Brandt C, Roehmel J, Rickerts V, Melichar V, Niemann N, Schwarz C. *Aspergillus* bronchitis in patients with cystic fibrosis. *Mycopathologia*. 2017;183(1):61–9.
 169. Kaditis AG, Miligkos M, Bossi A, Colombo C, Hatziagorou E, Kashirskaya N, et al. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on FEV1 in children and adolescents with cystic fibrosis: A european cystic fibrosis society patient registry analysis. *Archives of Disease in Childhood*. 2017;102(8):742–7.
 170. Slavin RG. ABPA in CF: A devastating combination. *Pediatric Pulmonology*. 1996;21(1):1–2.
 171. Ritz N, Ammann RA, Casaulta Aebischer C, Schoeni-Affolter F, Schoeni MH. Risk factors for allergic bronchopulmonary aspergillosis and sensitisation to *aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *European Journal of Pediatrics*. 2006;165(9):670–.
 172. Granchelli AM, Adler FR, Keogh RH, Kartsonaki C, Cox DR, Liou TG. Microbial Interactions in the Cystic Fibrosis Airway. *J Clin Microbiol*. 2018 Jul 26;56(8):e00354-18. doi: 10.1128/JCM.00354-18. PMID: 29769279; PMCID: PMC6062800

173. Reece E, Segurado R, Jackson A, McClean S, Renwick J, Grealley P. Co-colonisation with *aspergillus fumigatus* and *pseudomonas aeruginosa* is associated with poorer health in cystic fibrosis patients: An Irish Registry analysis. *BMC Pulmonary Medicine*. 2017;17(1).
174. Mowat E, Rajendran R, Williams C, McCulloch E, Jones B, Lang S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *aspergillus fumigatus* biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*. 2010;313(2):96–102.
175. Kaur J, Pethani BP, Kumar S, Kim M, Sunna A, Kautto L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *scedosporium aurantiacum*, an opportunistic fungal pathogen isolated from the lungs of cystic fibrosis patients. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6.
176. Zhao J, Yu W. Interaction between *pseudomonas aeruginosa* and *aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. *PeerJ*. 2018;6.
177. Sudfeld CR, Dasenbrook EC, Merz WG, Carroll KC, Boyle MP. Prevalence and risk factors for recovery of filamentous fungi in individuals with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010;9(2):110–6.
178. Burns JL, Van Dalfsen JM, Shawar RM, Otto KL, Garber RL, Quan JM, et al. Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1999;179(5):1190–6.
179. Poore TS, Hong G, Zemanick ET. Fungal infection and inflammation in cystic fibrosis. *Pathogens*. 2021;10(5):618.
180. Epps QJ, Epps KL, Young DC, Zobel JT. State of the art in Cystic Fibrosis Pharmacology Optimization of antimicrobials in the treatment of cystic fibrosis pulmonary exacerbations: III. executive summary. *Pediatric Pulmonology*. 2021;56(7):1825–37.
181. Frost, F. J., Nazareth, D. S., Charman, S. C., Winstanley, C., & Walshaw, M. J. (2019). Ivacaftor is associated with reduced lung infection by key cystic fibrosis pathogens. A cohort study using National Registry data. *Annals of the American Thoracic Society*, 16(11), 1375–1382. <https://doi.org/10.1513/annalsats.201902-122oc>

