



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MALATTIE INFETTIVE,

MICROBIOLOGIA E SANITÀ PUBBLICA

XXXIV Ciclo

Curriculum: Malattie Infettive

TESI SPERIMENTALE DI DOTTORATO

Monitoraggio terapeutico degli azoli e sviluppo di resistenza
antifungina in una popolazione adulta affetta da Fibrosi Cistica
con infezione delle vie aeree da funghi filamentosi

Relatore

Prof. Paolo Palange

Candidato

Dott. Marcello Di Paolo

ANNO ACCADEMICO 2020/21

A mio padre.

INDICE

1. ABSTRACT	1
2. INTRODUZIONE	3
3. LA FIBROSI CISTICA	8
3.1. DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA	8
3.2. LE BASI GENETICHE	10
3.3. PATOGENESI DEL DANNO POLMONARE	13
3.4. MANIFESTAZIONI CLINICHE	20
3.5. MICROBIOLOGIA CANONICA DELLA FIBROSI CISTICA	24
4. INFEZIONE DA FUNGHI FILAMENTOSI IN FIBROSI CISTICA	28
4.1. EPIDEMIOLOGIA E RILEVANZA CLINICA	28
4.2. STANDARDIZZAZIONE DELLE TECNICHE DI COLTURA	35
4.3. FARMACOCINETICA E MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEGLI AZOLI	40
4.4. RESISTENZA AGLI AZOLI	44
5. SEZIONE SPERIMENTALE	51
5.1. OBIETTIVI DELLO STUDIO	51
5.2. MATERIALI E METODI	51

5.2.1. <i>Disegno dello studio</i>	51
5.2.2. <i>Analisi statistica</i>	54
5.3. RISULTATI	56
5.3.1 <i>Caratteristiche dei partecipanti</i>	56
5.3.2. <i>TDM e analisi dei fattori di rischio associati al riscontro di livelli sub-terapeutici</i>	58
5.3.3. <i>Sensibilità agli azoli e sviluppo di resistenza nel tempo</i>	59
5.4. DISCUSSIONE	64
6. CONCLUSIONI	74
7. BIBLIOGRAFIA	76

1. ABSTRACT

Introduzione. La peculiare suscettibilità alle infezioni croniche delle vie aeree da parte di una moltitudine di patogeni rappresenta uno dei segni distintivi della Fibrosi Cistica (FC). Negli ultimi anni sempre più attenzione è stata dedicata al ruolo della colonizzazione da funghi filamentosi, *Aspergillus* spp. e non-*Aspergillus* (NAFF). I triazoli rappresentano frequentemente la terapia di prima scelta nel trattamento di queste infezioni. Tuttavia, il loro utilizzo implica necessariamente il ricorso al monitoraggio terapeutico farmacologico (TDM), a causa di una farmacocinetica estremamente variabile e della recente comparsa, a livello mondiale, di farmacoresistenza agli azoli.

Obiettivi. Analizzare l'utilizzo del TDM nella gestione clinica *real-life* di una popolazione adulta affetta da FC in terapia con azoli, identificare i fattori di rischio associati al riscontro di livelli plasmatici sub-terapeutici e valutare lo sviluppo di resistenza antifungina da parte delle specie isolate.

Metodi. È stata effettuata un'analisi retrospettiva longitudinale su di un'ampia casistica monocentrica inglese, selezionando tutti i pazienti adulti in trattamento con azoli nel periodo incluso tra il 2018 ed il 2019. Per ciascun paziente reclutato sono stati raccolti i dati relativi a: caratteristiche demografiche e indici di controllo della malattia, risultati degli esami microbiologici, terapia antifungina in atto e relativa indicazione, frequenza e risultati del TDM. Analisi di regressione logistica multivariata sono state effettuate per identificare i fattori di rischio associati al riscontro di livelli plasmatici sub-terapeutici e per indagare in merito all'eventuale associazione tra TDM sub-terapeutici e sviluppo di ceppi resistenti agli azoli. La probabilità di sviluppare resistenza antifungina nel periodo di osservazione è stata valutata mediante regressione univariata di Cox.

Risultati. Sono stati selezionati 91 pazienti adulti in trattamento con triazoli nel periodo di studio. È stata riscontrata un'elevata frequenza di TDM sub-terapeutici in corso di trattamento con itraconazolo in capsule (59.6%) e voriconazolo (60.8%), il cui utilizzo è stato identificato come unico fattore di rischio significativo associato al riscontro di livelli plasmatici sub-terapeutici ($P = 0.036$). Si è registrata una rapida emergenza di specie fungine resistenti ai triazoli, in particolare tra i pazienti trattati per colonizzazione da NAFF e bronchite da *Aspergillus*, con una probabilità del 21.4% dei partecipanti di sviluppare resistenza antifungina al termine dei 2 anni di osservazione. Non è stata osservata alcuna associazione significativa tra la presenza di livelli sub-terapeutici e lo sviluppo di resistenza agli azoli.

Conclusioni. Il presente studio evidenzia un'elevata prevalenza di livelli sub-terapeutici in corso di trattamento antifungino con azoli tra pazienti adulti affetti da FC, in particolare tra coloro in terapia con itraconazolo in capsule e voriconazolo. Il rapido e preoccupante sviluppo di ceppi resistenti ai triazoli sottolinea la necessità di istituire un'efficace *stewardship* antifungina per questi pazienti. Ulteriori studi longitudinali sono necessari per comprendere gli effetti della resistenza antifungina sui principali outcome clinici in FC e le implicazioni dei livelli sub-terapeutici dei triazoli sullo sviluppo della farmacoresistenza.

2. INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni si è assistito ad un significativo incremento del tasso di sopravvivenza dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC). I notevoli progressi compiuti nella conoscenza della patogenesi della malattia e nel riconoscimento del ruolo svolto, nella sua evoluzione, dalle principali complicanze associate, hanno consentito lo sviluppo di valide strategie terapeutiche, dimostratesi efficaci nel miglioramento dell'aspettativa di vita di questi pazienti.

Oltre all'ottimizzazione del trattamento medico e fisioterapico, la centralizzazione delle cure in strutture specialistiche ha contribuito in modo concreto al miglioramento della prognosi *quoad vitam*.¹ Va, difatti, riconosciuto il sostanziale cambiamento nella moderna gestione dei pazienti con FC rispetto al passato. Team dedicati, costituiti da specialisti esperti in ambito multidisciplinare, sono oramai indispensabili per garantire un corretto management pneumologico, infettivologico, nutrizionistico, epatologico ed endocrinologico di questi individui.

I dati epidemiologici riguardanti i principali Paesi industrializzati mostrano un trend in continua ascesa dell'aspettativa di vita di questi pazienti. Gli ultimi report dei registri di USA,² Canada³ e Regno Unito⁴ confermano questa tendenza e mostrano, inequivocabilmente, una sopravvivenza mediana predetta superiore a 48 anni (54.3 in Canada) per i pazienti nati nel 2019 (figura 2.1). Naturale conseguenza di questo fenomeno è un rapido e sostanziale incremento del numero dei pazienti adulti, cosicché nei Paesi con un livello di cura altamente sviluppato, questi costituiscono attualmente oltre il 50% dell'intera popolazione affetta da FC.²⁻⁵ I profondi cambiamenti demografici in atto determinano la necessità di inevitabili modifiche della gestione delle complicanze cliniche e psicosociali intrinsecamente correlate all'invecchiamento di questi pazienti. La transizione da centri di cura pediatrici a centri di cura

esclusivamente dedicati alla gestione del paziente adulto è fortemente raccomandata ed è attualmente riconosciuta quale essenziale al fine di garantire il più appropriato livello di cura per una malattia così complessa come la FC.¹

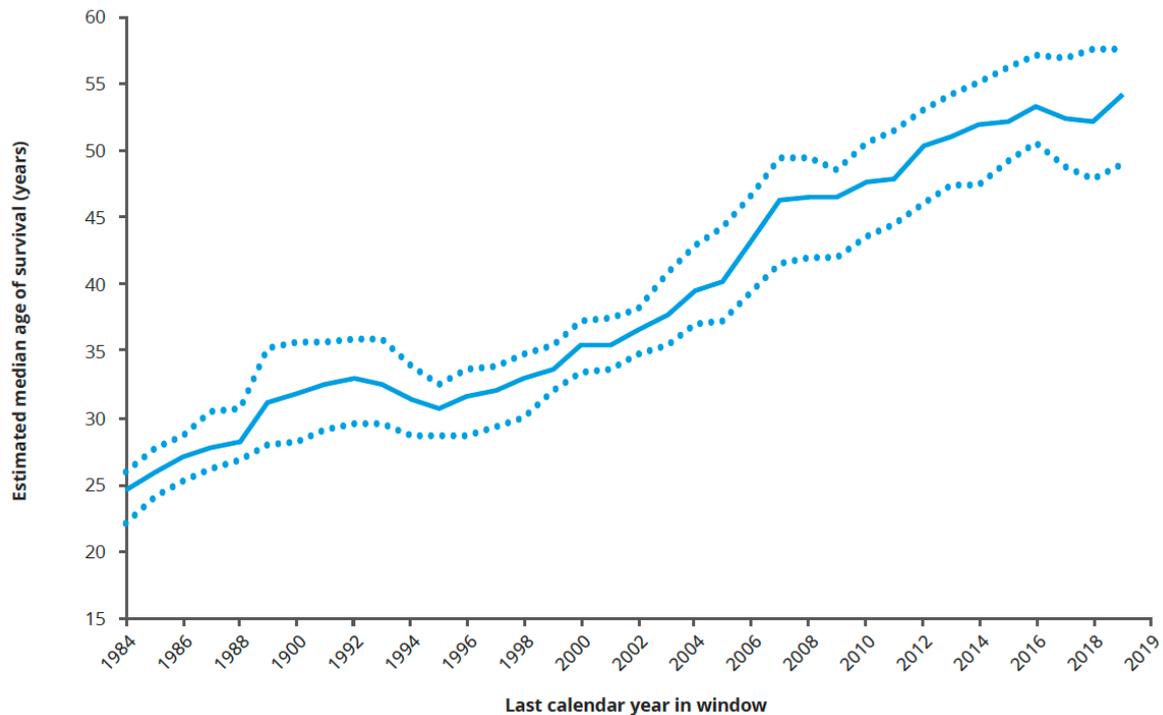


Figura 2.1. Trend crescente, dal 1984 al 2019, della sopravvivenza mediana predetta dei pazienti affetti da FC afferenti al Canadian Cystic Fibrosis Registry (da: 3).

Nella storia naturale della malattia, il progressivo deterioramento della funzionalità respiratoria è uno degli aspetti predominanti e l'insufficienza respiratoria terminale rimane, ancora oggi, la principale causa di morte nei pazienti affetti da FC.⁶ Il rallentamento del declino della funzionalità polmonare costituisce, pertanto, uno degli obiettivi clinici più importanti nella gestione dei pazienti FC ed interventi terapeutici capaci di incidere positivamente su questo outcome si sono dimostrati fondamentali nel miglioramento della loro sopravvivenza.

Tra i principali fattori responsabili dell'inesorabile progressione del danno polmonare vi è la

peculiare predisposizione di questi pazienti ad infezioni croniche delle vie aeree, spesso in forma polimicrobica. Da sempre l'interesse primario è stato rivolto - e continua a esserlo - sia nella pratica clinica che nell'ambito della ricerca scientifica e farmacologica, al ruolo delle infezioni batteriche da patogeni classicamente collegati alla FC (in primis *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) e, soltanto più recentemente, a quello di altre specie "emergenti", quali micobatteri non tubercolari (NTM) e *Burkholderia cepacia* complex. Tuttavia, negli ultimi vent'anni, in accordo con un numero crescente di evidenze scientifiche, sta destando sempre maggiore interesse il possibile ruolo di primo ordine svolto da parte di diverse specie fungine, quali *Aspergillus fumigatus* e altri funghi filamentosi non-*Aspergillus* (NAFF) - tra cui *Scedosporium apiospermum*, *Lomentospora prolificans*, *Exophiala dermatitidis* e *Rasamsonia argillacea* complex (figura 2.2) - nella progressione della malattia polmonare in FC.⁷⁻¹¹

Le casistiche internazionali più recenti riportano una prevalenza di *Aspergillus fumigatus* all'interno della popolazione FC pari a circa il 35%,^{12, 13} seppur con significative variazioni legate a diversi fattori demografici e geoclimatici. Oltre a essere il fungo filamentoso di gran lunga più frequentemente incontrato in FC, è anche il patogeno fungino più studiato, essendo responsabile di un ampio spettro di manifestazioni cliniche, che vanno dalla semplice colonizzazione asintomatica alle forme di ipersensibilità patologica o, seppur raramente, alle forme invasive polmonari.¹⁴⁻¹⁷ Se da una parte sono ormai ben noti gli effetti negativi dello sviluppo di aspergillosi broncopolmonare allergica (ABPA) sulla funzione polmonare e sui principali outcome clinici in FC, evidenze contrastanti sono, invece, disponibili in merito alla potenziale patogenicità delle altre forme di colonizzazione cronica da *Aspergillus* spp. così come da altre muffe,^{7, 15} rendendo particolarmente disomogeneo l'approccio gestionale e terapeutico a queste entità cliniche nei vari centri di cura nel mondo.^{11, 18}

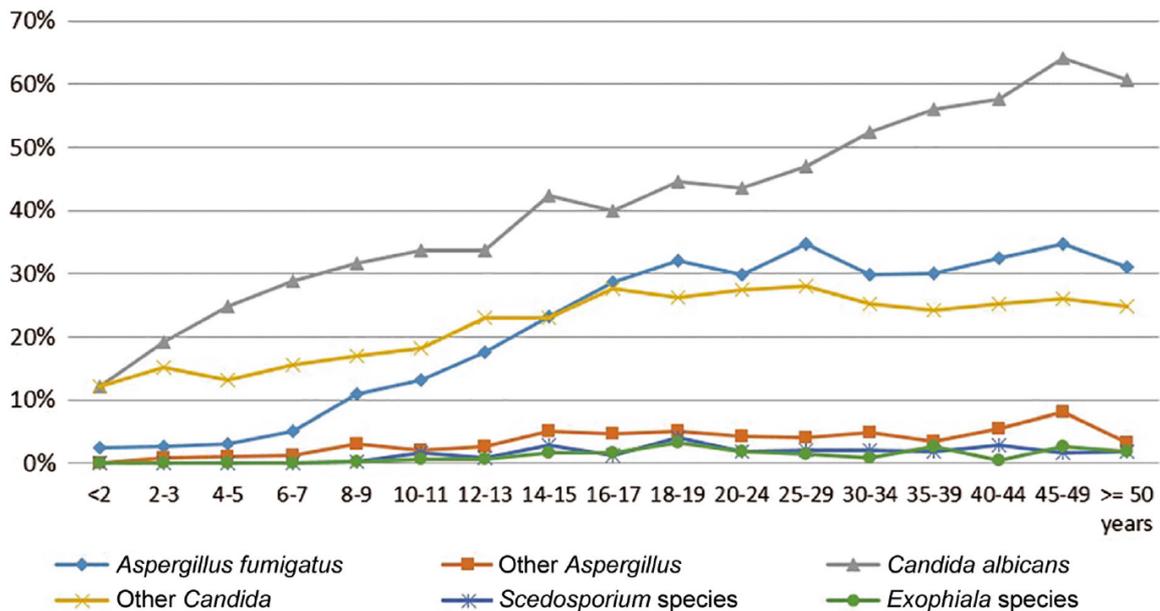


Figura 2.2. Prevalenza delle principali specie fungine, distribuita per fasce di età, nella popolazione FC tedesca (da: 10).

Gli azoli sono comunemente impiegati quali agenti di prima scelta nel trattamento delle infezioni fungine in FC. Tuttavia, a causa di una farmacocinetica particolarmente variabile, resa ancora più complessa dalle caratteristiche intrinseche della FC,¹⁹ il ricorso al monitoraggio terapeutico farmacologico (*therapeutic drug monitoring*, TDM) degli azoli è di assoluta importanza al fine di ottimizzare i risultati terapeutici, minimizzando al contempo la possibilità di sviluppare eventi avversi²⁰. Il regolare ricorso al TDM può risultare particolarmente impegnativo da attuare nella pratica clinica comune, dal momento che richiede tempistiche precise, risorse dispendiose in termini di mezzi e personale, così come metodiche diagnostiche non sempre disponibili. Per una popolazione relativamente giovane, indipendente e spesso in età lavorativa, questo può costituire una sfida particolarmente significativa, con un ulteriore livello di complessità venutosi recentemente a sommare a causa della pandemia da SARS-CoV2.

Nel contesto specifico della FC, i pochi studi di farmacocinetica disponibili hanno dimostrato

una notevole variabilità interindividuale.¹⁹ Tuttavia, ad oggi, non sono stati ancora pubblicati studi derivanti dall'esperienza *real-life* sull'impiego del TDM dei triazoli e sulle conseguenze di livelli plasmatici sub-ottimali in FC. La conoscenza di questi aspetti comincia ad assumere una certa rilevanza, in virtù di una prevalenza non più trascurabile dei patogeni fungini in FC e di una significativa disomogeneità culturale da tempo nota nell'approccio e nella gestione delle infezioni fungine tra i diversi centri di cura dei singoli Paesi, così come a livello internazionale.

L'importanza del TDM è, oltretutto, evidenziata dalla insorgenza, su scala globale, di tassi crescenti di resistenza ai comuni agenti antifungini.^{21, 22} Prevalenze fino al 16% di ceppi resistenti agli azoli di *Aspergillus fumigatus* sono stati descritti recentemente in diverse casistiche FC europee.^{23, 24} Nella maggior parte dei casi, gli isolati sono caratterizzati da mutazioni classicamente acquisite a livello ambientale in seguito alla pressione selettiva esercitata dall'uso su larga scala di agenti fungicidi nel settore agricolo. Tuttavia, sono descritti e ormai sempre meglio caratterizzati anche i meccanismi molecolari che portano allo sviluppo di resistenza indotta dall'uso prolungato degli stessi azoli,²¹ uno scenario tutt'altro che infrequente nella pratica clinica del paziente affetto da FC. Le implicazioni cliniche nella malattia polmonare fungina in FC non sono ancora definite, ma va tenuto in considerazione che la multi- o pan-resistenza agli azoli è stata chiaramente riconosciuta come fattore prognostico negativo nell'aspergillosi invasiva e nell'aspergillosi polmonare cronica in diverse popolazioni non affette da FC. Inoltre, ad oggi, non è ancora stato indagato in maniera sistematica il possibile ruolo dell'esposizione protratta a livelli plasmatici sub-terapeutici degli azoli nello sviluppo di resistenza antifungina nella popolazione affetta da FC, oggetto della presente tesi.

3. LA FIBROSI CISTICA

3.1. DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA

La FC è una malattia diffusa dell'epitelio di trasporto che colpisce la secrezione dei liquidi delle ghiandole esocrine e l'epitelio di rivestimento del tratto respiratorio, gastrointestinale e riproduttivo.²⁵ Nei pazienti affetti, tale patologia conduce ad un'abnorme viscosità delle secrezioni mucose, che ostruiscono gli organi cavi, causando la gran parte delle caratteristiche cliniche di questo disturbo, come l'interessamento prominente delle vie aeree con infezioni ricorrenti e sviluppo di malattia respiratoria cronica, l'insufficienza pancreatica, la malnutrizione, la steatorrea, l'ostruzione intestinale, la cirrosi epatica e la sterilità maschile. Queste manifestazioni possono comparire in qualsiasi epoca della vita, potendosi presentare in maniera variamente combinata tra loro, di paziente in paziente, determinando in tal modo una notevole variabilità di fenotipo clinico.

La FC è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva, in cui i soggetti eterozigoti, portatori di un singolo allele mutato, sono asintomatici.

È la più comune malattia genetica letale che si manifesta nelle popolazioni caucasiche, in particolare nelle popolazioni dell'Europa settentrionale, del Nord America e in Australia.⁶ Sulla base della frequenza dei pazienti omozigoti affetti nella popolazione bianca, si valuta che il 2 - 4% di questa sia rappresentata da portatori sani. La prevalenza alla nascita varia di Paese in Paese e a seconda dell'etnia. Difatti, a livello globale, la FC si presenta con una frequenza approssimativa di 1:3000 nei caucasici, 1:4000 - 10000 nei latino-americani e 1:15000 - 20000 negli afroamericani. È, invece, infrequente in Africa e in Asia, con una prevalenza stimata, in Giappone, di circa 1:350000 (figura 3.1).²⁶

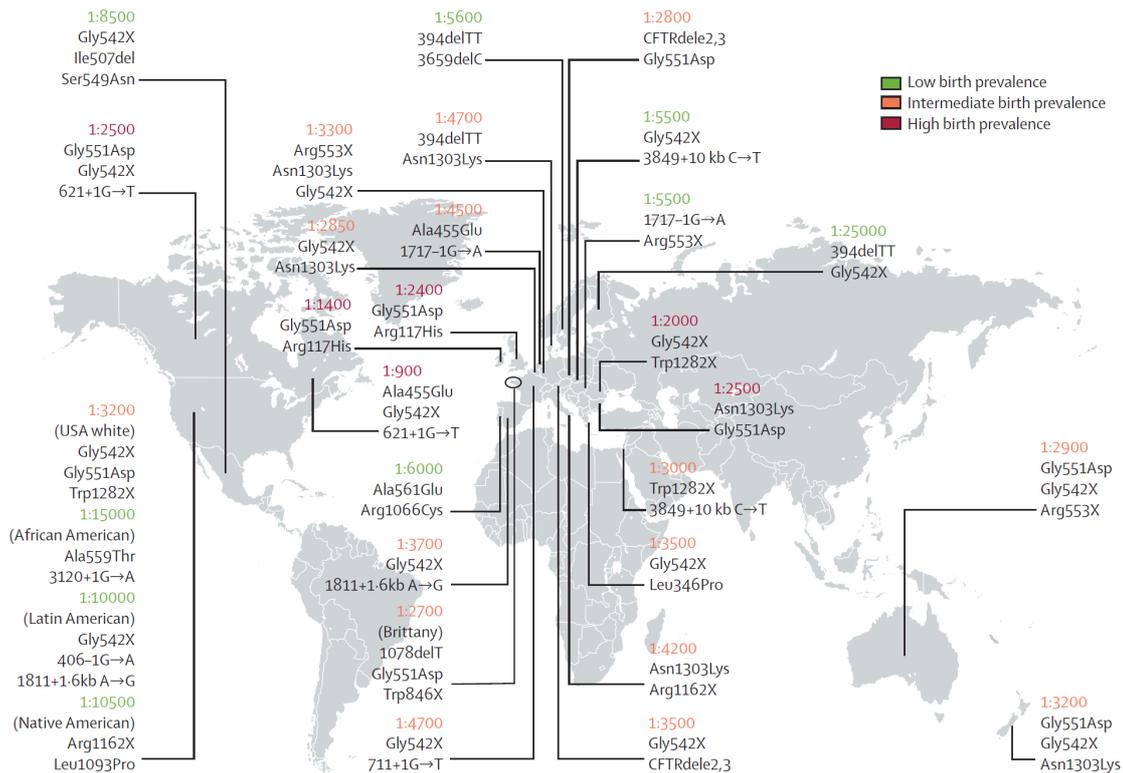


Figura 3.1. Stime della prevalenza alla nascita e mutazioni comuni in diverse regioni del mondo (da: 26).

I dati demografici relativi al nostro Paese sono illustrati dall'ultimo rapporto del Registro Italiano²⁷ e mostrano una prevalenza, aggiornata al biennio 2017-18, compresa tra i 6 e i 13 pazienti ogni 100000 residenti, con una notevole variazione interregionale, probabilmente influenzata anche da un fenomeno di sottotifica. Nel 2018, inoltre, è stata stimata un'incidenza di 18.4 nuovi casi ogni 100000 nati vivi (1 su 5442). Circa il 65% delle diagnosi avviene entro il primo anno di vita. L'età mediana alla diagnosi (0 - 3 mesi) mostra un trend in continuo calo da quando è stata regolamentata, dal punto di vista legislativo, l'introduzione del test di screening neonatale. L'età media alla diagnosi è, invece, relativamente elevata, (attualmente di circa 6 anni), fenomeno dovuto alla presenza di un 12% di casi diagnosticati in età adulta (≥ 18 anni).

3.2. LE BASI GENETICHE

Il difetto primitivo nella FC è rappresentato da un'anomala funzione della proteina conosciuta come Regolatore della Conduttanza Transmembrana della Fibrosi Cistica (CFTR), il cui gene codificante è collocato sul braccio lungo del cromosoma 7, banda q31.2.^{28 - 32}

Il gene CFTR si estende per circa 250kb sul cromosoma 7, codificante per una proteina di 1480 aminoacidi. Essa presenta due domini transmembrana (TMD), due domini citoplasmatici leganti i nucleotidi (NBD), e un dominio regolatore R, contenente multipli siti di fosforilazione, bersagli delle proteine chinasi A e C. I due domini transmembrana formano un canale attraverso il quale passa il cloruro (figura 3.2). L'attivazione del canale CFTR richiede la fosforilazione del dominio R mediata dalla protein-chinasi A e il legame dell'adenosina trifosfato (ATP) in corrispondenza dei siti NBD.^{33, 34}

A partire dalla sua scoperta, sono emerse diverse importanti sfaccettature riguardo le funzioni del CFTR. Nonostante agisca principalmente da canale ionico per il cloruro, esso svolge, tramite i propri domini leganti i nucleotidi, numerose altre funzioni regolatrici, tra le quali l'inibizione del trasporto del sodio attraverso il canale epiteliale del sodio (ENaC), l'interazione con i canali Kir6.1 per il potassio, l'inibizione dei canali del cloro attivati dal calcio, la regolazione dei cosiddetti canali esocellulari del cloro (o *outward rectifiers*) e dei processi coinvolti nel trasporto dell'ATP e nell'acidificazione delle vescicole e degli organelli intracellulari.^{35 - 37} Tra queste, l'interazione del CFTR con l'ENaC ha probabilmente la maggiore rilevanza fisiopatologica nella FC; inoltre, è ormai accertato che il CFTR sia un mediatore del trasporto attivo di ioni bicarbonato.³⁸ Specifiche variazioni alleliche del gene CFTR determinano una marcata alterazione del trasporto dello ione HCO_3^- , con trasporto

del cloruro completamente o notevolmente conservato:³⁹ in questi casi, l'insufficienza pancreatica è praticamente sempre presente.

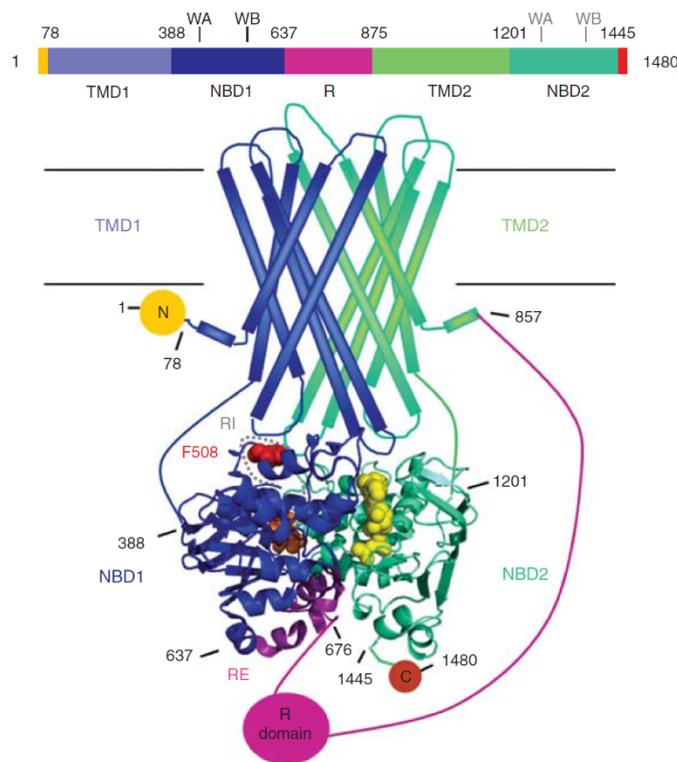


Figura 3.2. Struttura terziaria del canale CFTR (da: 34).

Da quando il gene CFTR è stato clonato nel 1989, sono state scoperte oltre 2000 mutazioni genetiche, raccolte nel database CFTR2 (The Clinical and Functional TRanslation of CFTR),⁴⁰ consultabile gratuitamente on-line e frutto di un'iniziativa internazionale, ideata e sviluppata dalla Johns Hopkins University (Baltimora, MD, USA) e supportata dalla Cystic Fibrosis Foundation, volta all'identificazione delle caratteristiche funzionali e delle relative conseguenze sul fenotipo clinico di ciascuna delle mutazioni a oggi note.

La delezione di tre nucleotidi che codificano per un residuo di fenilalanina in posizione 508 (nota come $\Delta F508$) è la più comune alterazione genetica riscontrata nei pazienti con FC. Essa rappresenta, da sola, approssimativamente il 90% degli alleli mutati nelle popolazioni del

Nord Europa e del Nord America.⁴¹ A livello mondiale nessun'altra mutazione è responsabile di oltre il 5% dell'intero novero di mutazioni esistenti. Va, tuttavia, ricordato che circa il 15% delle varianti alleliche note del gene CFTR non sembrano essere associate a sviluppo di malattia.⁶

Le mutazioni del gene CFTR sono raggruppate in 6 classi,^{41, 42} in base al loro effetto sulla proteina CFTR (figura 3.3). In generale, le mutazioni di classe I - III sono solite causare forme più severe di patologia rispetto a quelle di classe IV - VI. Ciononostante, le implicazioni cliniche di una specifica combinazione di mutazioni sono spesso poco chiare, probabilmente a causa dell'influenza di geni cosiddetti modificatori e di variabili ambientali.

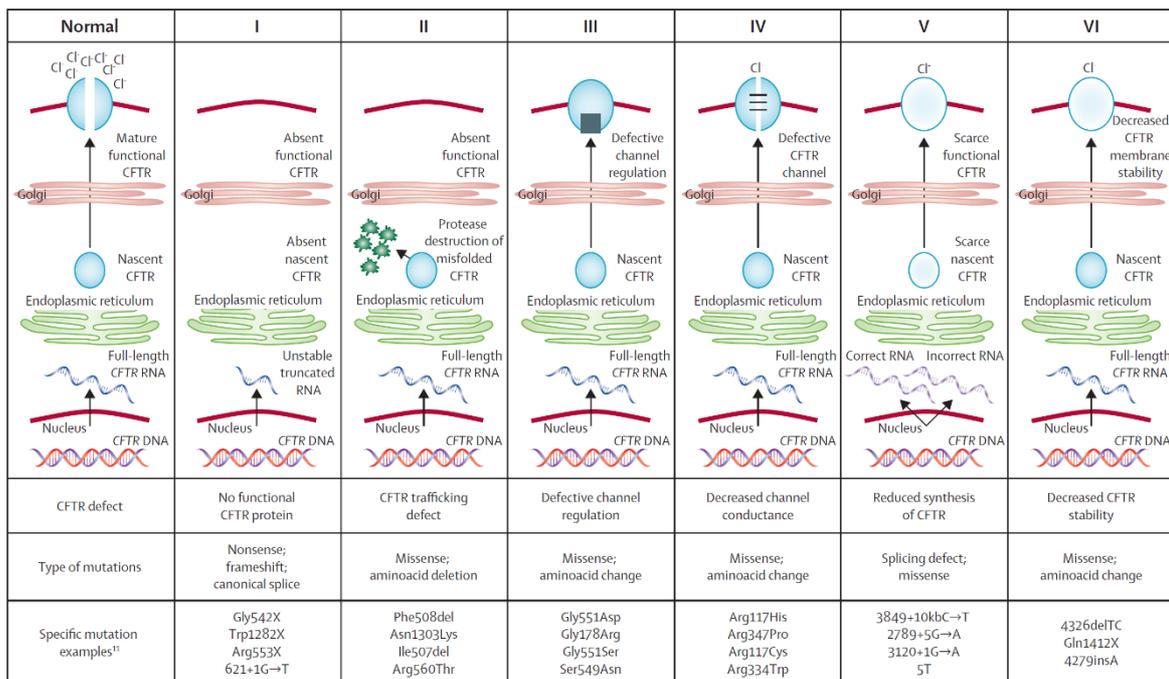


Figura 3.3. Classificazione funzionale delle mutazioni del gene CFTR (da: 41).

Difatti, le correlazioni genotipo-fenotipo sono deboli, in particolare per quanto riguarda le manifestazioni polmonari, mentre sembrano essere più valide per quel che concerne l'interessamento pancreatico⁴³. Tuttavia, vi è una certa corrispondenza tra la riduzione

quantitativa, rispetto alla norma, del CFTR funzionante e il rischio di sviluppare un fenotipo clinico più severo^{6, 43} (figura 3.4). Numerosi studi hanno dimostrato che determinati polimorfismi nei geni codificanti per il *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1) e per la *Mannose Binding Lectin-2* (MBL-2), presenti in circa il 20% dei pazienti affetti dal fenotipo classico della malattia, sono associati ad una maggiore gravità della malattia polmonare e ad un incrementato rischio di infezioni croniche da *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*.^{44, 45}

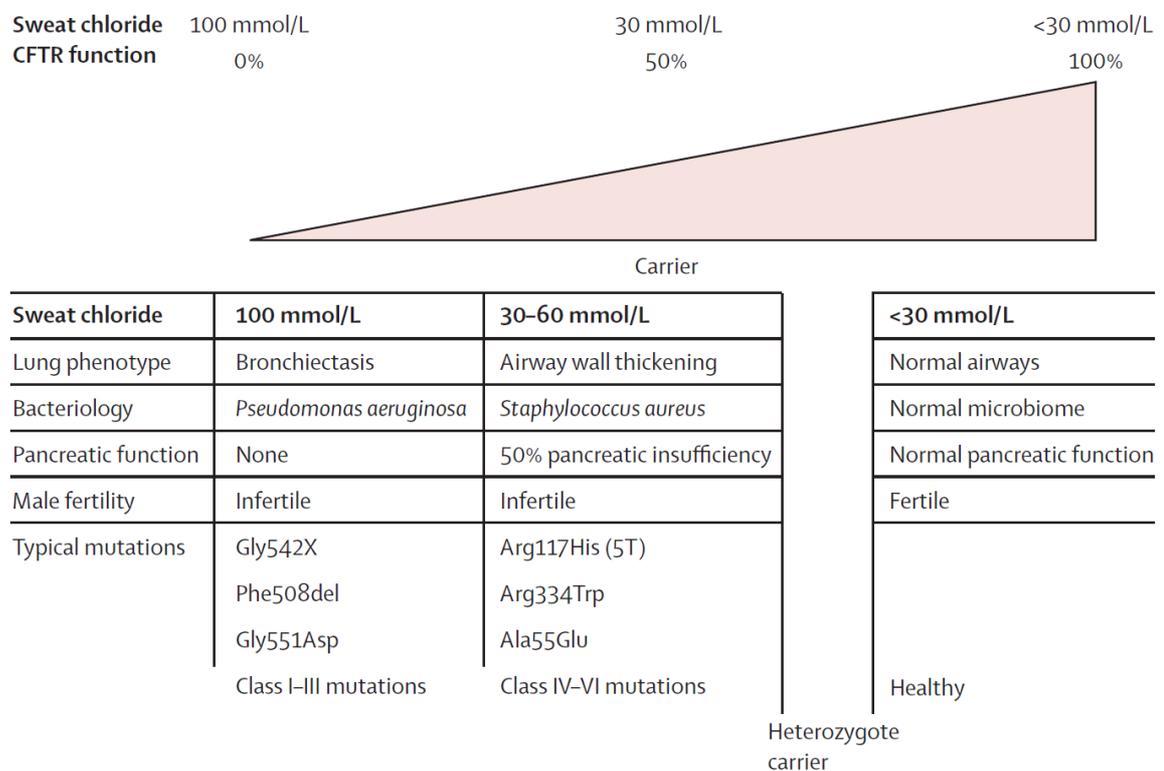


Figura 3.4. Relazioni tra genotipo, funzione residua del CFTR e fenotipo clinico in pazienti con FC, portatori sani e soggetti sani (da: 6).

3.3. PATOGENESI DEL DANNO POLMONARE

Vi è accordo unanime sul fatto che i difetti nel trasporto ionico e nell'omeostasi elettrolitica siano intimamente correlati al danno d'organo nella FC. Ciononostante, la precisa base molecolare di tale connessione non è stata ancora completamente chiarita.

Se, da una parte, le ghiandole sudoripare dei soggetti affetti da FC presentano delle anomalie dell'omeostasi idrosalina ben comprese (figura 3.5), che costituiscono il razionale alla base dell'utilizzo del cosiddetto test del sudore quale *gold standard* per la diagnosi di FC, dall'altra non esiste, tuttora, un modello patogenetico unico capace di spiegare la connessione esistente tra mancato funzionamento del CFTR e danno d'organo polmonare della FC.

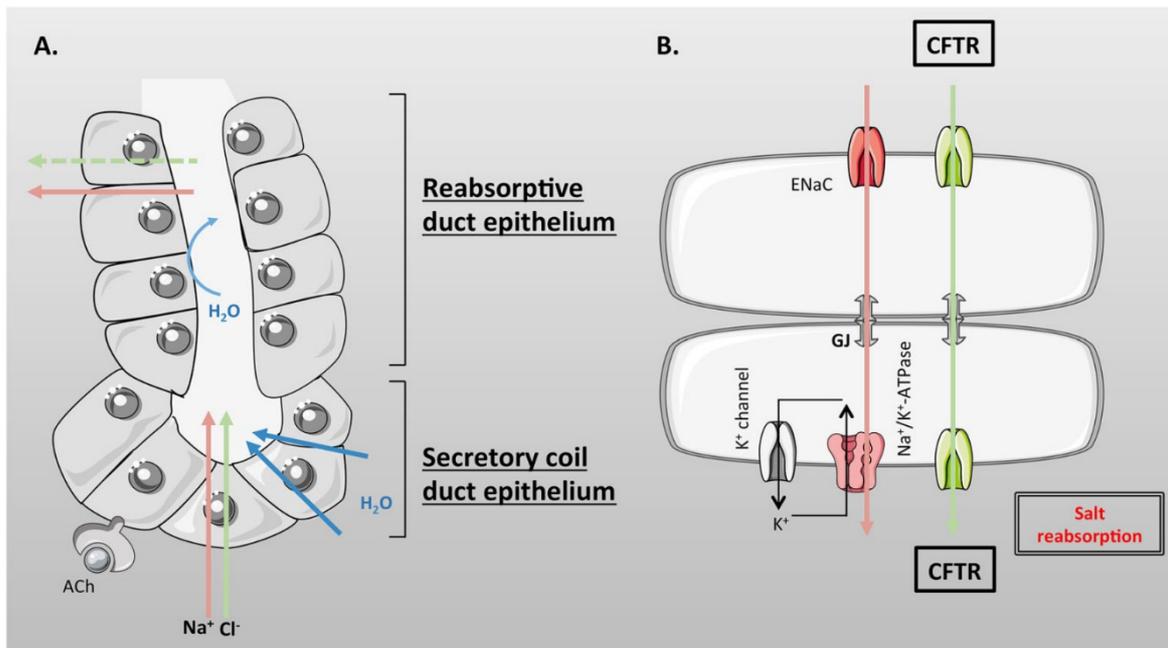


Figura 3.5. Ruolo del CFTR nel normale funzionamento del trasporto ionico nelle ghiandole sudoripare. A) L'epitelio del tubulo convoluto secerne NaCl e acqua principalmente in risposta a uno stimolo colinergico (acetilcolina, ACh). B) Le cellule dell'epitelio del dotto riassorbente esprimono costitutivamente il CFTR su entrambi i poli apicale e basolaterale della membrana cellulare. I canali ENaC e CFTR, sfruttando il gradiente elettrochimico del sodio garantito dall'azione continua della pompa Na^+/K^+ , co-operano per mediare il trasporto trans-cellulare di ioni Na^+ e Cl^- dal lume duttale al versante basale dell'epitelio (da: 46).

La letteratura scientifica più recente, a riguardo, avanza diverse ipotesi, non mutuamente esclusive, supportate da evidenze scientifiche talora discordanti.^{26, 46 - 48} La perdita della fisiologica escrezione di ioni Cl^- e HCO_3^- e le interazioni con altri canali cellulari, in primis l'ENaC (figura 3.6), sembrerebbero essere responsabili di un eccessivo riassorbimento di ioni Na^+ , con conseguente disidratazione del liquido periciliare e alterazione della fisiologia

clearance muco-ciliare. Questa ipotesi è stata, tuttavia, messa in discussione da recenti studi, che hanno confutato la presenza di un iper-risassorbimento di sodio a livello delle vie aeree di diversi modelli animali di FC.⁴⁸

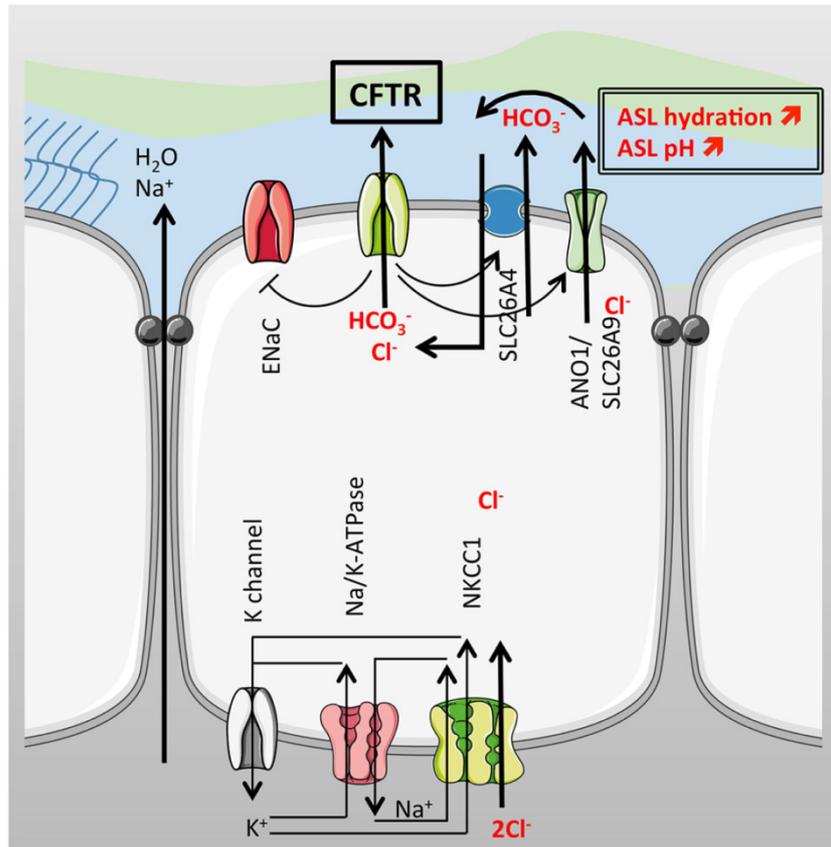


Figura 3.6. Ruolo del CFTR nel normale funzionamento del trasporto ionico a livello dell'epitelio bronchiale. Il CFTR, facilitato da un gradiente elettrochimico garantito dall'azione costitutiva della pompa Na^+/K^+ sul versante basocellulare, garantisce una continua secrezione di ioni Cl^- e HCO_3^- nel liquido periciliare (ASL). Inoltre, le interazioni con altri canali di superficie permettono al CFTR di regolare il riassorbimento del sodio (da: 46).

La presenza di ioni HCO_3^- è, altresì, fondamentale per il corretto dispiegamento del muco sulla superficie cellulare e la sua naturale fluidità. La disfunzione del CFTR risulterebbe, dunque, in un muco altamente viscoso e di difficile eliminazione, con conseguente formazione

di vere e proprie placche di muco disidratato sull'epitelio bronchiale, con nicchie ipossiche facilmente colonizzabili da numerose specie batteriche, in particolare *Pseudomonas aeruginosa*.⁴⁹

In aggiunta, il CFTR, mediante la regolazione del trasporto di ioni HCO_3^- , non solo regola l'osmolarità del liquido periciliare, ma ne determina anche il livello di acidità. Un'importante serie di esperimenti effettuati con liquido periciliare ricavato dalle vie aeree di modelli suini di FC ha dimostrato che i processi di eliminazione batterica sono estremamente dipendenti dal pH.^{50,51} Pertanto, ipertonicità e iperacidità del liquido periciliare sarebbero alla base della disfunzione di importanti molecole antibiotiche endogene dell'immunità innata, quali la β -defensina 1, con il risultato di favorire la persistenza di specie batteriche altrimenti eliminabili.⁵²

È stato, inoltre, postulato che la disregolazione della risposta infiammatoria del paziente sia da considerare il difetto primitivo nella FC.⁵³ A sostegno di tale ipotesi sta il riscontro di concentrazioni abnormemente elevate di mediatori pro-infiammatori (TNF- α , metaboliti dell'acido arachidonico, IL-6, IL-8) nelle colture di cellule FC ed in saggi di tessuto prelevati *ex-vivo* da soggetti non infetti.⁵⁴⁻⁵⁶ A conferma del possibile ruolo svolto da un'alterata risposta immunitaria nell'innescare il danno delle vie aeree vi è il riscontro di segni di infiammazione su campioni di liquido di lavaggio broncoalveolare in bambini affetti da FC, non infetti, già all'età di sole 4 settimane di vita.⁵⁷ Inoltre, diversi studi hanno evidenziato il ruolo svolto dal CFTR nella secrezione, tra le altre, di molecole antiossidanti (glutazione e tiocianato) e nel cosiddetto processo di "restituzione epiteliale", fondamentale nella differenziazione terminale delle cellule dell'epitelio bronchiale in risposta a un danno delle vie aeree.⁴⁶

È stato chiamato in causa un ulteriore meccanismo direttamente correlato alla perdita di funzione del CFTR che spiegherebbe, almeno in parte, la peculiare predisposizione dei soggetti

affetti all'infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa*. La proteina CFTR rappresenta, difatti, un sito di ancoraggio del batterio alle vie aeree, tramite il legame con il lipopolisaccaride. Nei soggetti sani, questo tipo di interazione porta ad un'attivazione del *signaling* dell'NF- κ B e conseguente attivazione, rapida ed autolimitantesi, dell'immunità innata. Nei pazienti con FC, questa risposta immunitaria viene, invece, perduta.^{58, 59}

D'altronde, è noto come il processo infiammatorio cronico perpetuato da *Pseudomonas aeruginosa*, che colonizza le vie aeree di questi soggetti per oltre 40 anni, sia uno dei principali fattori alla base del progressivo decadimento della funzionalità respiratoria proprio della FC. Il danno polmonare è principalmente immuno-mediato, non essendovi invasione tissutale da parte del microrganismo. È stato dimostrato da più studi,^{60 - 62} anche con analisi dettagliate dell'intero genoma batterico, che in questo contesto non vi è alcuna espressione da parte di *Pseudomonas aeruginosa* di quei fattori di virulenza associati all'insorgenza di processi infettivi acuti. Vi è, piuttosto, una specifica attivazione genica atta al mantenimento di questo particolare tipo di tropismo, innescata da fattori ambientali, primo fra tutti, l'ambiente fortemente ipossico delle dense secrezioni mucose. Peculiari di questo adattamento cronico sono:

- la *downregulation* della produzione di esotossine;
- la perdita della catena laterale "O" del lipopolisaccaride;
- l'espressione di un involucro di alginato (fenotipo mucoide) che protegge il batterio dalla fagocitosi e dagli antibiotici;
- la frequente perdita di pili e flagello.

Questo complesso fenotipo non invasivo, ma persistente, sembrerebbe essere frutto di un processo evolutivo che ha portato alla selezione di ceppi capaci di silenziare selettivamente

quei fattori di virulenza responsabili della risposta immunitaria dell'ospite. In aggiunta, la perdita di aggressività di questi ceppi patogeni è controbilanciata dalla difettosa risposta battericida, propria della mucosa respiratoria del paziente con FC.^{51, 52, 63}

La formazione di biofilm o macrocolonie e lo *shift* verso il fenotipo mucoide da parte di *Pseudomonas aeruginosa* sono eventi essenziali per il persistere dell'infezione, e sono associati ad un incremento notevole della resistenza al trattamento antibiotico.^{62, 64} All'interno del biofilm, la bassa tensione di O₂ e la limitata disponibilità di ferro favoriscono la crescita anaerobica del batterio e ne rallentano il tasso di proliferazione. In queste condizioni, l'efficacia dei β-lattamici è ovviamente scarsa, così come lo è quella degli aminoglicosidi, impotenti in ambienti anaerobi.⁶⁵ Sembra, peraltro, che concentrazioni sub-inibitorie degli stessi aminoglicosidi siano in grado di indurre, *in vitro*, la formazione del biofilm.⁶⁶ Allo stesso modo, la formazione dell'involucro di alginato con generazione di ceppi mucoidi, incrementa la formazione del biofilm batterico, l'elusione delle difese immunitarie e la resistenza agli antibiotici. Oltre all'anaerobiosi ambientale, sembra che anche i livelli estrogenici dell'ospite contribuiscano all'input di tale conversione, rendendo tale fenomeno di più frequente riscontro nei pazienti di sesso femminile.⁶⁷

Ad aumentare la complessità micro-ambientale determinata dall'infezione da *Pseudomonas*, si aggiunge un'ulteriore scoperta riguardante la produzione, da parte di quest'ultimo, di una molecola, l'N-ossido-4-idrossi-2-epitilchinolone (HQNO), in grado di proteggere ceppi di *Staphylococcus aureus* dall'effetto degli aminoglicosidi, facilitandone lo sviluppo in microcolonie.⁶⁸

L'insieme di questi complessi meccanismi descritti di adattamento genetico e di interazioni con fattori ambientali e altre specie batteriche prende il nome di *quorum sensing*, un sistema di

comunicazione intercellulare basata sulla densità cellulare fondamentale per la formazione del biofilm e la sopravvivenza alla pressione antibiotica.^{64, 69}

La complessa rete di meccanismi suddetti, nel tempo, porta all'inevitabile conseguenza della malattia polmonare cronica (figura 3.7).

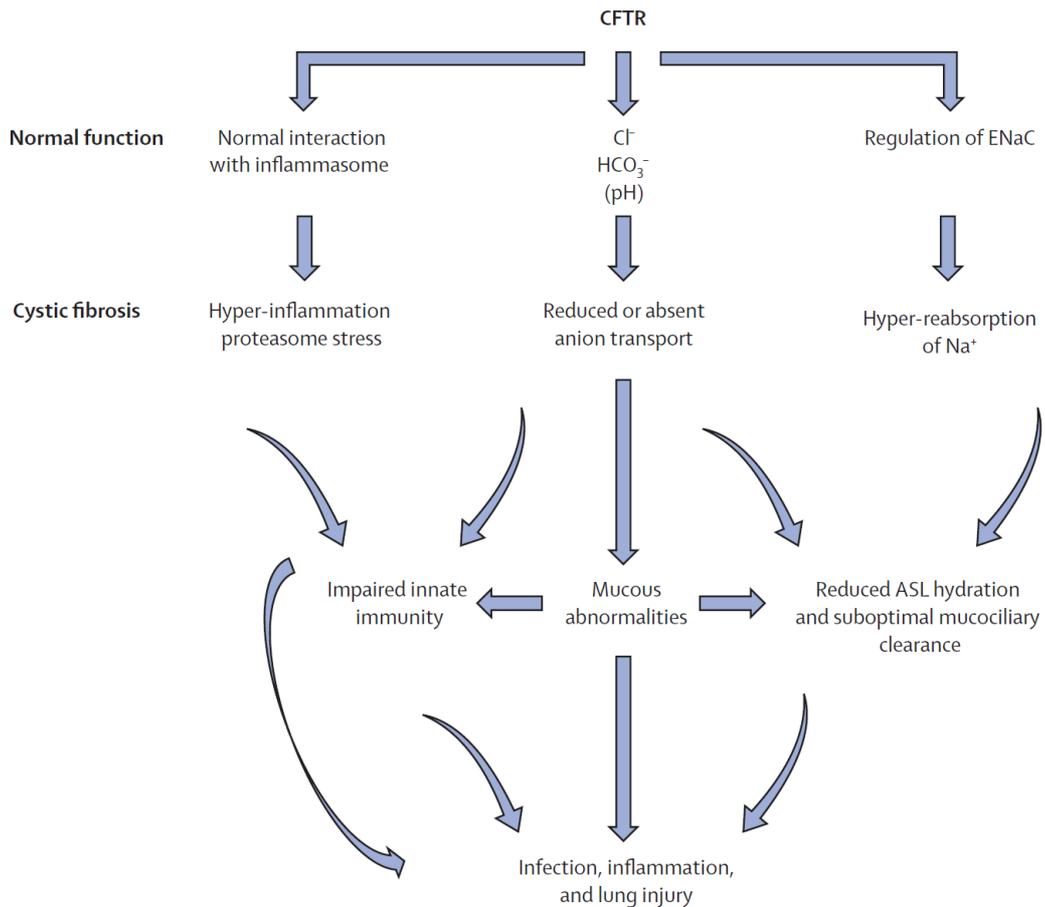


Figura 3.7. Effetti della disfunzione del CFTR nella patogenesi del danno polmonare nella FC. ASL: liquido periciliare (da: 6).

Il rimodellamento delle vie aeree inizia precocemente nella FC. La precisa sequenza degli eventi che prendono parte a questo processo non è stata, però, ancora del tutto chiarita. Tradizionalmente è stato concepito come una logica conseguenza di ripetuti insulti infiammatori ed infettivi;⁴⁸ tuttavia, nuove evidenze istopatologiche mettono in dubbio tale interpretazione e suggeriscono che, alla base di tale processo, contribuiscano, in modo

prominente, anche alterazioni primarie direttamente correlate alla disregolazione immunitaria secondaria alla disfunzione del CFTR, di cui si ipotizza lo sviluppo addirittura in fase prenatale^{70, 71} (figura 3.8).

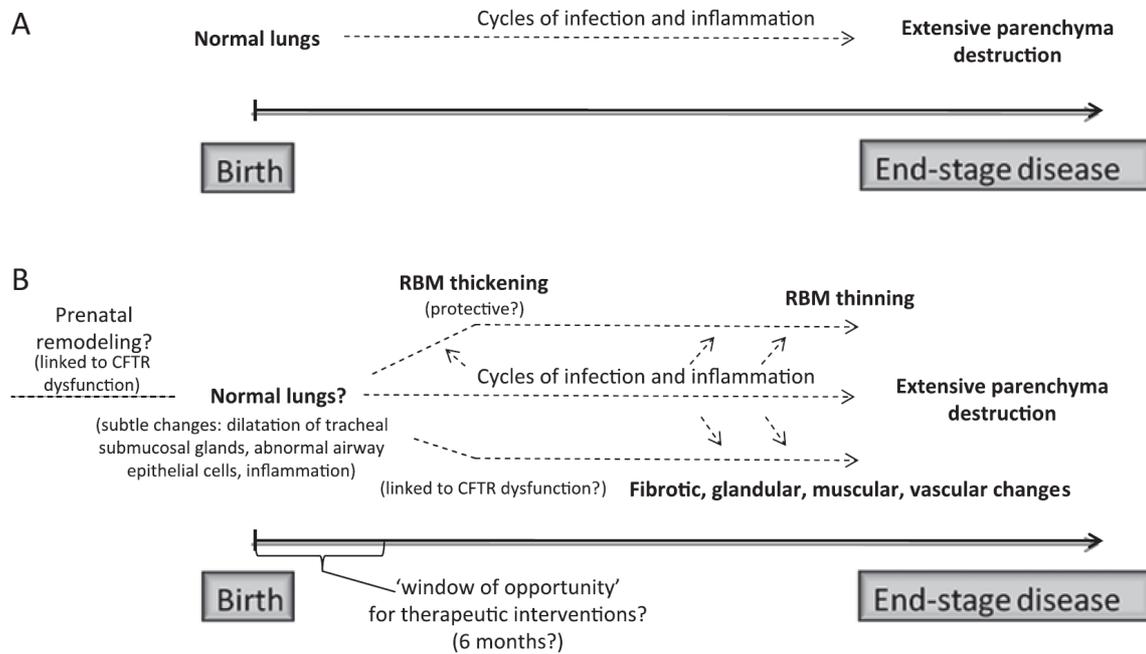


Figura 3.8. Modelli patogenetici proposti per il rimodellamento delle vie aeree nella FC. A) Ipotesi classica. B) Ipotesi alternativa. RBM: membrana basale reticolare (da: 70).

3.4. MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il complesso fenotipo clinico della FC comprende, solitamente, almeno una delle manifestazioni elencate nella figura 3.9. Sebbene si tratti di una nomenclatura non più raccomandata,⁷² la distinzione tra una forma di presentazione “classica” ed una “non classica” rimane ancora saldamente presente nella letteratura scientifica internazionale più recente.

Nella forma “classica” di FC si riscontra l’interessamento multisistemico peculiare della malattia, con concomitante positività al test del sudore⁷³ ($Cl^- > 60$ mmol/L). Il fenotipo “classico” include infezioni polmonari croniche con frequenti riacutizzazioni, insufficienza respiratoria cronica, rinosinusite cronica con poliposi nasale, insufficienza pancreatica,

diabete, malnutrizione severa con possibile ritardo di crescita, alterazioni della motilità intestinale (fino all'occlusione) e, nei maschi, infertilità. Manifestazione sempre più comune con l'aumentare dell'aspettativa di vita di questi pazienti è, inoltre, l'epatopatia cronica su base cirrotica biliare focale. Difatti, dopo le complicanze polmonari e quelle legate al trapianto di polmone, la patologia epatica è la causa di morte più comune nei pazienti con FC.^{2, 5}. Inoltre, frequente è la concomitanza di disturbi del tono dell'umore, con quadri di ansia e depressione presenti in una percentuale prossima al 30% già in età infantile-adolescenziale.⁷⁴

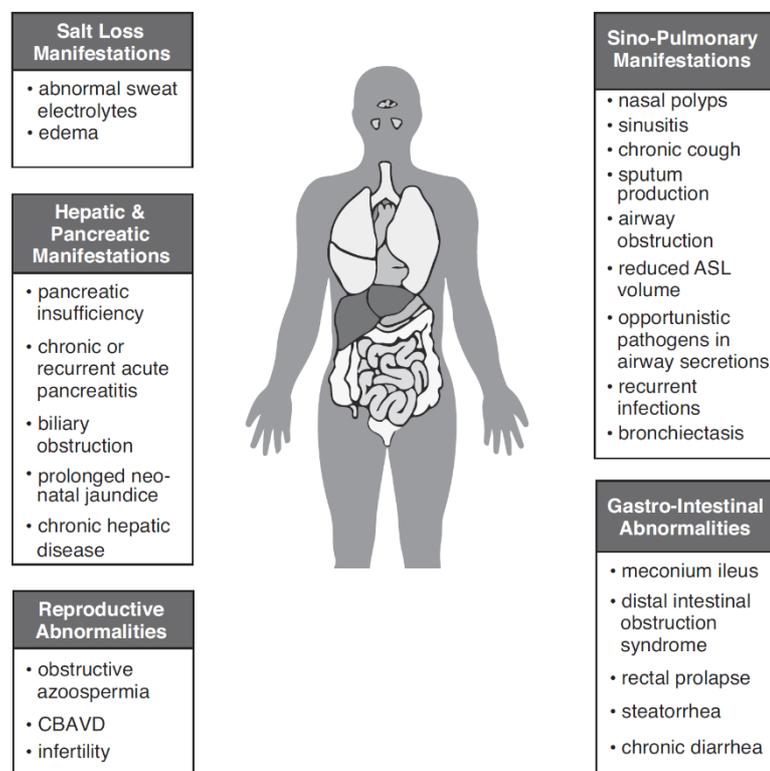


Figura 3.9. Manifestazioni cliniche comuni nel fenotipo “classico” della FC. CBAVD: assenza congenita bilaterale dei vasi deferenti; ASL: liquido periciliare (da: 73).

Il progressivo decadimento della funzionalità polmonare fino alla franca insufficienza respiratoria rimane, nella storia naturale della malattia, la complicanza più frequente e severa ed è, tuttora, responsabile di circa il 60% delle morti nei pazienti con FC.^{2, 5, 27}

Dal punto di vista clinico, la sintomatologia respiratoria compare precocemente nei pazienti affetti da FC, essendo la manifestazione d'esordio in almeno il 40% dei casi. Sintomo più comune è la tosse, cronica e solitamente produttiva, con espettorato purulento; a questa si associano solitamente episodi di dolore toracico, dispnea da sforzo, senso di costrizione toracica e sibili respiratori. Altri segni clinici comprendono episodi ripetuti di pneumotorace spontaneo, emoftoe ed emottisi, talora letali.⁷⁵

Inevitabilmente, i periodi di stabilità clinica sono intervallati da ricorrenti riacutizzazioni polmonari. Pur mancando di una definizione unanime,^{76 - 78} questi episodi sono caratterizzati da un incremento più o meno repentino dei sintomi respiratori preesistenti, con aumento dell'espettorato e cambiamento delle sue caratteristiche fisiche. Possono associarsi, inoltre, sintomi sistemici quali febbre (benché non comune), intensa astenia, marcato peggioramento delle condizioni generali e dello stato nutrizionale a causa dell'aumentato metabolismo basale. Riduzioni cospicue del peso corporeo e delle prove di funzionalità respiratoria, così come l'incremento degli indici di flogosi agli esami ematochimici e variazioni del quadro radiologico rispetto al basale sono di aiuto nella diagnosi di una riacutizzazione. Questi episodi, la cui severità può variare notevolmente tra pazienti e nell'arco della vita dello stesso paziente, richiedono l'utilizzo di terapie antibiotiche, frequentemente per via endovenosa e quindi in regime di ricovero, e intaccano in modo significativo la qualità della vita, la funzione polmonare e la prognosi dei pazienti.^{6, 76, 78} Rappresentano, dunque, uno degli outcome più importanti nella gestione della malattia e nello sviluppo di studi clinici.⁷⁷

Dal punto di vista radiologico, la radiografia del torace può risultare priva di segni particolari anche per molti anni; tuttavia, minimi segni di interessamento polmonare sono già distinguibili nella prima decade di vita, in particolare sotto forma di iperinflazione polmonare. Col passare del tempo, divengono via via più evidenti un marcato rinforzo della trama bronco-

vascolare, opacità polmonari e bronchiectasie diffuse. La tomografia computerizzata (TC) offre una risoluzione maggiore del quadro patologico polmonare (figura 3.10), con la possibilità di una migliore identificazione dei segni più precoci di sovvertimento strutturale e di una valutazione più precisa della progressione di malattia.⁷⁹

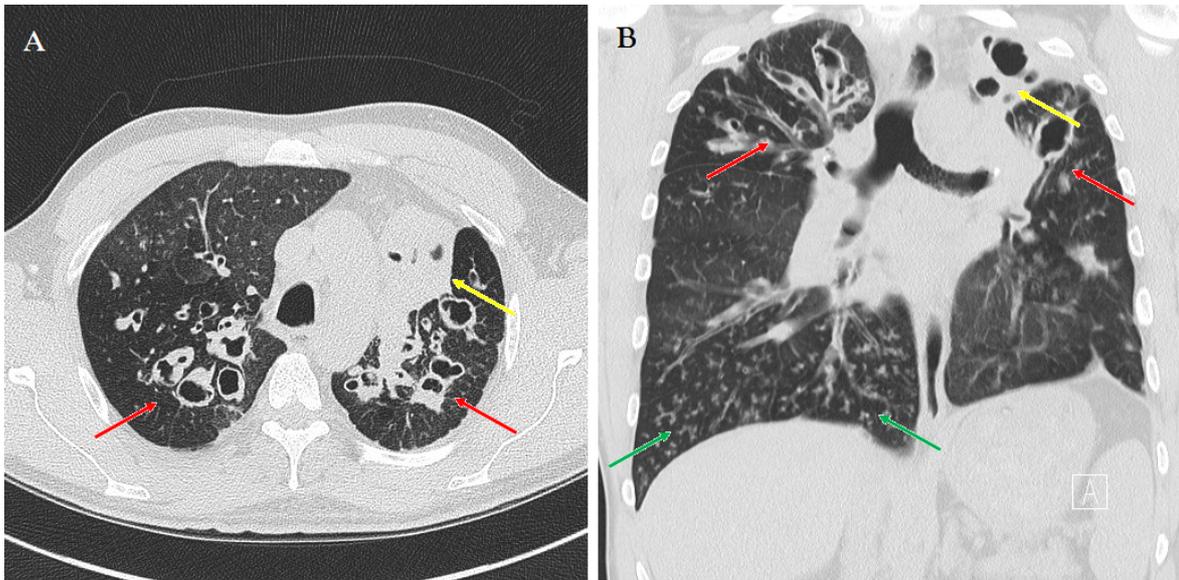


Figura 3.10. TC del torace di un paziente affetto da FC. A) sezione assiale; B) sezione coronale. Sono evidenziati i seguenti reperti: bronchiectasie multiple, contenenti vistose secrezioni mucose al loro interno, con distribuzione principalmente a carico di entrambi i lobi superiori (freccie rosse); atelettasia parziale del lobo superiore sinistro (freccia gialla) e diffuso pattern “ad albero in fiore”, particolarmente evidente a carico del lobo inferiore destro (freccie verdi).

Le prove di funzionalità respiratoria (PFR) rappresentano lo strumento più comunemente impiegato per monitorare il decorso della patologia a livello polmonare.⁸⁰ I reperti più sensibili nell'identificazione delle alterazioni precoci sono la presenza di *air trapping* e la riduzione del flusso espiratorio forzato medio ($FEF_{25\%-75\%}$). Al progredire della malattia, la spirometria rivela un continuo declino del volume espiratorio forzato dopo un secondo (FEV_1) e del rapporto tra questo e la capacità vitale forzata ($FEV_1/FVC < 0,7$), classiche stimate di un pattern ventilatorio ostruttivo conclamato. Nelle fasi più avanzate di malattia, lo sviluppo di iperinflazione statica determina una riduzione significativa della FVC.

3.5. MICROBIOLOGIA CANONICA DELLA FIBROSI CISTICA

Tipicamente, già dalla prima infanzia le vie aeree dei soggetti affetti da FC vengono colonizzate da microrganismi patogeni. La peculiare epidemiologia delle infezioni delle vie aeree nella FC è stata descritta per decenni² (figure 3.11 - 3.13).

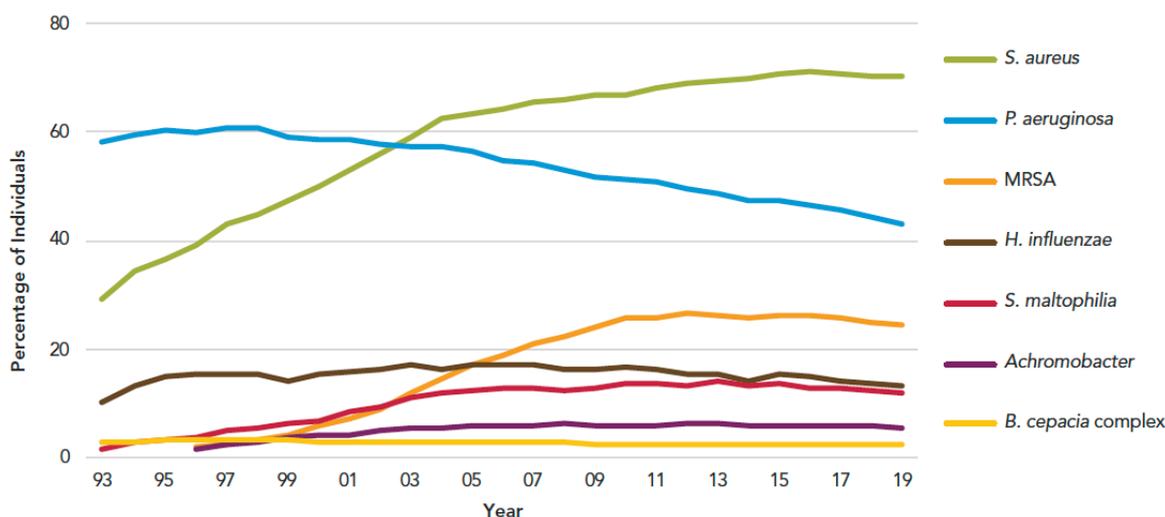


Figura 3.11. Prevalenza dei principali microrganismi isolati dalle vie aeree dei pazienti FC statunitensi dal 1990 al 2016 (da: 2).

La prevedibile progressione delle colonizzazioni è universale, avendo inizio generalmente con ceppi non tipizzabili di *Haemophilus influenzae* e di *Staphylococcus aureus* e progredendo verso l'infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa*. Nonostante siano riconosciuti numerosi fattori che predispongono questi individui alle infezioni respiratorie, le motivazioni precise alla base di questa specifica evoluzione temporale sono ancora poco note.

La prevalenza di *Staphylococcus aureus* nelle secrezioni di questi pazienti è di circa il 60% nel primo anno di vita, e tocca punte dell'80% durante l'adolescenza, per poi diminuire nel corso dell'età adulta. In circa il 30% dei pazienti, si tratta di un'infezione da parte di ceppi meticillino-resistenti (MRSA). Dai 18 anni in su, circa il 70% dei pazienti è infetto da *Pseudomonas aeruginosa* (16.9% dei casi rappresentato da ceppi *multi-drug resistant*). La

prevalenza complessiva di quest'ultimo è andata progressivamente riducendosi negli ultimi 20 anni, quale risultato di politiche di eradicazione sempre più diffuse e l'elaborazione di protocolli antibiotici validati a tal fine. Circa il 3% dei pazienti con FC di qualsiasi età (l'8% tra gli adulti) è colonizzato da specie batteriche del cosiddetto *Burkholderia cepacia* complex. Deve ancora essere chiarita del tutto la prevalenza effettiva e la significatività clinica di altri agenti infettanti di comune riscontro, quali *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens* e *Alcaligenes* spp.

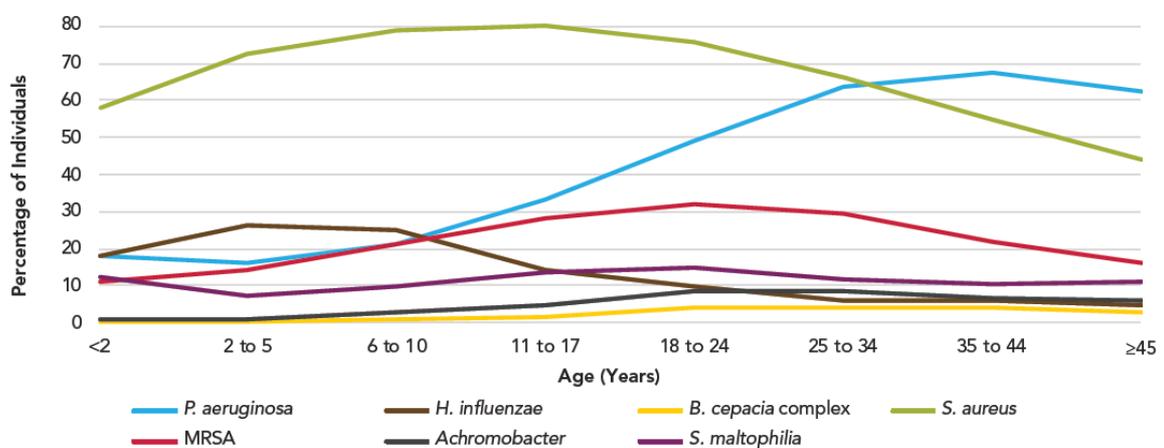


Figura 3.12. Evoluzione età-correlata della prevalenza dei principali patogeni nelle vie aeree dei pazienti statunitensi affetti da FC. MRSA: *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (da: 2).

L'importanza di *Pseudomonas aeruginosa* nell'induzione di un accelerato declino della funzione polmonare è stata accertata^{81, 82} e, per tale motivo, una stretta sorveglianza microbiologica e multipli tentativi di eradicazione antibiotica sono diventati capisaldi nella gestione del paziente FC.²⁶ Tuttavia, *Pseudomonas aeruginosa* non è l'unica specie batterica associata ad un più rapido peggioramento della funzione polmonare. Sempre più evidenze confermano un incremento di morbilità e mortalità nei pazienti con infezione da MRSA, *Mycobacterium abscessus* e diverse specie afferenti al *Burkholderia cepacia* complex (per es. *cenocapacia*, *multivorans*, *vietnamiensis* e *gladioli*).⁸³ In particolare, in considerazione dello scarso successo nei

pazienti sottoposti a trapianto polmonare, la colonizzazione da parte di quest'ultimo, così come da *Mycobacterium abscessus*, è considerata criterio di esclusione nella maggior parte dei centri trapianti in tutto il mondo.⁶ Inoltre, l'infezione da *Burkholderia* spp. può occasionalmente evolvere in una sepsi fatale, la cosiddetta *cepacia syndrome*.²⁶ L'appurata aggressività di questo gruppo di microrganismi e la conferma della possibilità di una loro trasmissione tra pazienti hanno portato allo sviluppo di apposite raccomandazioni internazionali sulle misure di prevenzione e controllo delle *cross*-infezioni.^{83, 84} Il rispetto e la continua implementazione di queste misure costituisce un punto cardine nell'attività di un centro specializzato nella gestione del paziente FC.⁶

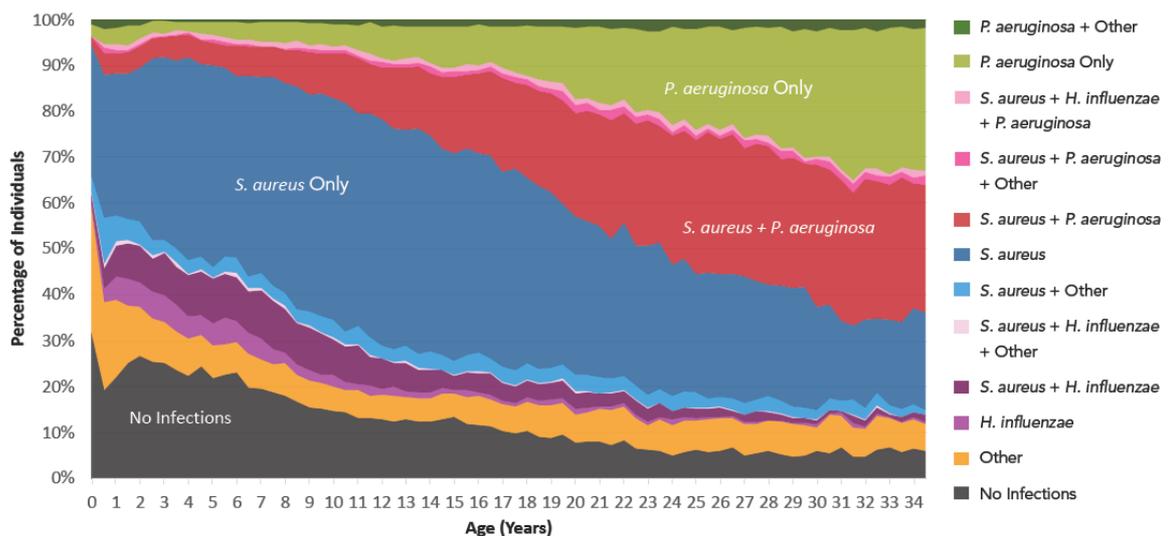


Figura 3.13. Principali pattern di biodiversità età-correlata della flora patogena riscontrati nelle vie aeree dei pazienti statunitensi affetti da FC (da: 2).

Menzione specifica merita l'infezione da micobatteri non tubercolari (NTM), la quale è emersa negli ultimi anni come una delle più importanti complicanze associate alla FC,⁸⁵ in virtù delle difficoltà diagnostiche, della complessità dei protocolli terapeutici disponibili e di preoccupanti evidenze scientifiche che ne hanno dimostrato la possibilità di trasmissione diretta tra pazienti.^{86, 87} Dati discordanti tra i vari registri nazionali ed internazionali riportano

una prevalenza di colonizzazioni da NTM compresa tra l'1 e il 14%;^{2-5,27,88} tale variabilità può essere, in parte, riconducibile ad una ricerca non sistematica in diversi centri di cura e a metodiche di coltura non standardizzate. Le specie più comunemente identificate in Nord America ed in Europa risultano essere *Mycobacterium avium* complex (MAC, che include *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. chimaera*) e *Mycobacterium abscessus* complex (MABSC, che comprende le sottospecie *abscessus*, *bolletii* e *massiliense*), seguite da *M. kansasii* e *M. fortuitum*.⁸⁵ Gli NTM possono determinare una malattia infiammatoria progressiva a carico del polmone (NTM-PD) associata ad un accelerato declino della funzionalità polmonare e definita dalla presenza di specifiche caratteristiche cliniche, laboratoristiche e radiologiche.⁸⁹ Tuttavia, la possibilità di colonizzazioni transitorie, intermittenti o anche permanenti senza sviluppo di NTM-PD, così come l'eventuale necessità di trattamenti antibiotici combinati, prolungati (> 12 mesi) e scarsamente tollerati^{85,90} e le possibili conseguenze sulla candidabilità o meno al trapianto polmonare rendono estremamente complesso porre indicazione all'eradicazione.

4. INFEZIONE DA FUNGHI FILAMENTOSI IN FIBROSI CISTICA

4.1. EPIDEMIOLOGIA E RILEVANZA CLINICA

Tra le specie fungine filamentose, il microrganismo di più frequente riscontro nei pazienti con FC è sicuramente *Aspergillus fumigatus*. Secondo i dati più recenti dei principali registri internazionali,^{3,4} la sua prevalenza si attesta intorno al 17%, con una tendenza annuale in progressiva riduzione e con significative variazioni nelle diverse fasce di età, come già osservato per altri microrganismi in FC (vedi cap. 3.5). Tuttavia, diverse casistiche^{91 - 94} riportano prevalenze ben superiori, dal 30% al 78%, a dimostrazione di un'ampia variabilità dipendente, in parte, da fattori geografici e ambientali e, in parte, dalla diversa sensibilità delle tecniche di coltura e identificazione impiegate nella ricerca di *A. fumigatus* e, più in generale, delle specie fungine in FC. Inoltre, frequente è anche l'isolamento di altre specie non-*fumigatus* di *Aspergillus* spp. (in primis *flavus*, *terreus* e *niger*), descritto in percentuali variabili tra l'1 ed il 13%,^{92 - 95} non raramente in colonizzazione mista con altre specie fungine (*Aspergillus* e NAFF). L'età dei pazienti, l'utilizzo di corticosteroidi inalatori e di terapie antibiotiche croniche (macrolidi ed antibiotici anti-*Pseudomonas aeruginosa* per via inalatoria) sono riconosciuti quali fattori di rischio per la colonizzazione da *Aspergillus fumigatus* in FC.⁹⁶

Aspergillus fumigatus è classicamente ritenuto responsabile di un ampio spettro di manifestazioni cliniche - che va dalla colonizzazione asintomatica fino alle forme invasive e potenzialmente letali di malattia - il quale dipende dalle complesse interazioni tra patogeno e sistema immunitario dell'ospite¹⁴ (figura 4.1). Nonostante i numerosi processi responsabili della compromissione dell'immunità innata descritti nei pazienti affetti da FC,^{15, 97} le manifestazioni invasive di aspergillosi polmonare, così come lo sviluppo di *fungus ball* (aspergilloma), sono sorprendentemente ed estremamente rare.

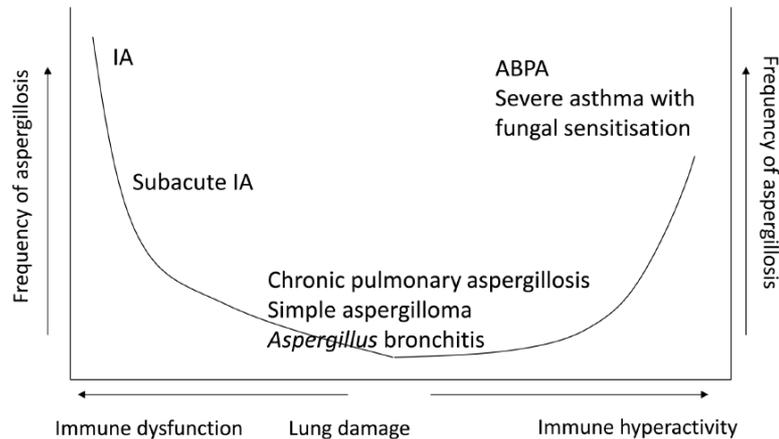


Figura 4.1. Spettro delle possibili manifestazioni cliniche di aspergillosi polmonare in relazione alla risposta immunitaria dell'ospite. IA: aspergillosi invasiva; ABPA: aspergillosi broncopolmonare allergica (da: 14).

Lo studio di Baxter et al.¹⁶ ha posto le basi per una classificazione standardizzata delle manifestazioni cliniche dell'aspergillosi polmonare nel paziente affetto da FC, fondata su dati microbiologici (esame colturale, galattomannano su espettorato, RT-PCR per *Aspergillus*) e sierologici (IgE totali e IgE/IgG specifiche anti-*Aspergillus fumigatus*). Dalla combinazione di questi dati nascono quattro possibili entità cliniche: colonizzazione da *Aspergillus*, sensibilizzazione ad *Aspergillus*, aspergillosi broncopolmonare allergica (ABPA) e bronchite da *Aspergillus*^{7, 16, 17} (figura 4.2).

	Aspergillus colonization	ABPA	Aspergillus sensitization	Aspergillus bronchitis
Aspergillus-specific PCR	±	+	±	+
Sputum galactomannan	-	+	-	+
Total IgE	-	+	+	-
Specific anti-A. fumigatus IgE	-	+	+	-
Specific anti-A. fumigatus IgG	-	+	-	+

Figura 4.2. Criteri combinati dei dati microbiologici ed immunologici per la classificazione delle diverse entità cliniche di aspergillosi polmonare in FC. ABPA: aspergillosi broncopolmonare allergica; PCR: *polymerase chain reaction* (da: 7).

Con una prevalenza variabile nelle diverse casistiche internazionali fino al 15% dei pazienti,^{2, 4, 5, 15} l'ABPA rappresenta una tra le complicanze più frequenti, più note e più studiate in FC. Lo sviluppo di questa complicanza è legato ad una eccessiva risposta immunitaria di tipo Th2, con elevati livelli di citochine IL-4, IL-5 e IL-13 che determinano l'*upregulation* di recettori per IgE a bassa affinità sulle cellule B, l'incremento dei livelli di IgE totali e IgE e IgG specifiche anti-*Aspergillus* e, infine, l'attivazione di una reazione da ipersensibilità di tipo I e III.⁷ La diagnosi è basata sui criteri proposti dalla US Cystic Fibrosis Foundation (CFF)⁹⁸ (figura 4.3) e dalla International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM).⁹⁹

	Classic Case	Minimal Criteria
1	Acute or subacute clinical deterioration and decline in pulmonary function not attributable to another cause	Acute or subacute clinical deterioration and decline in pulmonary function not attributable to another cause
2	Elevated serum IgE concentrations >1000 IU/ml	Elevated serum IgE concentrations >500 IU/ml
3	Immediate skin prick test reactivity to <i>Aspergillus</i> antigen or presence of specific IgE antibodies to <i>A. fumigatus</i>	Immediate skin prick test reactivity to <i>Aspergillus</i> antigen or presence of specific IgE antibodies to <i>A. fumigatus</i>
4	Precipitating antibodies to <i>A. fumigatus</i> or elevated serum IgG to <i>A. fumigatus</i>	And ONE of the following: a) Precipitating antibodies to <i>A. fumigatus</i> or elevated serum IgG to <i>A. fumigatus</i> , OR b) New or recent pulmonary infiltrates
5	New or recent pulmonary infiltrates	

Figura 4.3. Criteri diagnostici della Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference del 2003 per la diagnosi di ABPA in FC (da: 17).

L'ABPA è causa riconosciuta di instabilità clinica e progressione della malattia polmonare in FC^{7, 15 - 17} ed è caratterizzata da frequenti episodi riacutizzazione con broncospasmo serrato, sviluppo di bronchiectasie centrali e infiltrati polmonari con tappi di muco iperdensi (impatti mucoidi) all'*imaging*, accelerato declino della funzionalità polmonare e incremento dei markers di ipersensibilità (IgE totali, IgE e IgG specifiche). L'ABPA complica significativamente la gestione dei pazienti affetti e richiede solitamente l'utilizzo di terapie steroidee sistemiche prolungate, eventualmente associate all'uso di agenti ad azione antifungina.

La classificazione proposta da Baxter et al.¹⁶ ha avuto il merito di consentire un sempre più diffuso riconoscimento appropriato dell'entità clinica nota come bronchite da *Aspergillus*.

Recenti casistiche ne riportano una prevalenza variabile fino al 9%.¹⁰⁰ Clinicamente simile a una classica riacutizzazione polmonare, determina sovente una destabilizzazione del quadro clinico e accelerazione del declino funzionale polmonare, richiedendo frequenti accessi ospedalieri.^{16, 17, 100, 101} Il suo riconoscimento è di particolare importanza poiché, nella maggior parte dei casi, è sensibile alla terapia antifungina.

Il termine colonizzazione implica di per sé la presenza di un microrganismo che non provoca né sintomi né risposta immunitaria; ciononostante, la colonizzazione può rappresentare un punto di partenza per potenziale replicazione e futura infezione. In tale contesto, la sensibilizzazione si riferisce allo sviluppo di una risposta di ipersensibilità Th2- e IgE-mediata nei confronti di *Aspergillus*, in assenza di tutto il corollario clinico e laboratoristico tipico dell'ABPA. Colonizzazione e sensibilizzazione sono entità cliniche solitamente asintomatiche; tuttavia, nel paziente affetto da un impegno respiratorio sintomatico e funzionale significativo, con frequenti riacutizzazioni, riuscire a comprendere quanto il quadro sovrapposto di una colonizzazione con/senza sensibilizzazione da *Aspergillus* possa contribuire all'instabilità clinica nel singolo individuo costituisce un'ardua sfida per il clinico. Numerosi studi hanno indagato in merito al possibile impatto clinico della semplice colonizzazione delle vie aeree da *Aspergillus fumigatus* in FC,^{16, 96, 101 - 105} ottenendo risultati controversi e spesso di difficile interpretazione, anche alla luce di importanti cofattori quali l'età delle popolazioni in esame¹⁰² e la presenza o meno di co-infezione cronica con *Pseudomonas aeruginosa*¹⁰³ e altri patogeni classici. Rimane, pertanto, ancora incompreso l'effetto indipendente della colonizzazione da *Aspergillus* su parametri quali stabilità clinica, progressione funzionale e radiologica di malattia, riacutizzazioni polmonari, qualità della vita e mortalità in FC.^{7, 8, 15, 97, 106}

Nel corso degli ultimi 10 - 15 anni la letteratura scientifica si è arricchita di un numero progressivamente crescente di studi focalizzati sulle numerose specie fungine non-*Aspergillus*

colonizzanti le vie aeree dei pazienti affetti da FC e sul loro possibile significato clinico. Tra le più frequentemente riscontrate e descritte in letteratura vi sono le specie dello *Scedosporium/Lomentospora* complex, seguite da *Penicillium* spp., *Exophiala dermatitidis* e *Rasamsonia* spp (in particolare *Rasamsonia argillacea*).¹⁰⁷ In una recente analisi effettuata su di un'ampia casistica multicentrica olandese, su un totale di 3787 campioni delle vie aeree ottenuti da circa 700 pazienti FC, sono state identificate ben 107 diverse specie fungine filamentose, di cui 92 rappresentate da specie fungine non-*Aspergillus*⁹³ (figura 4.4).

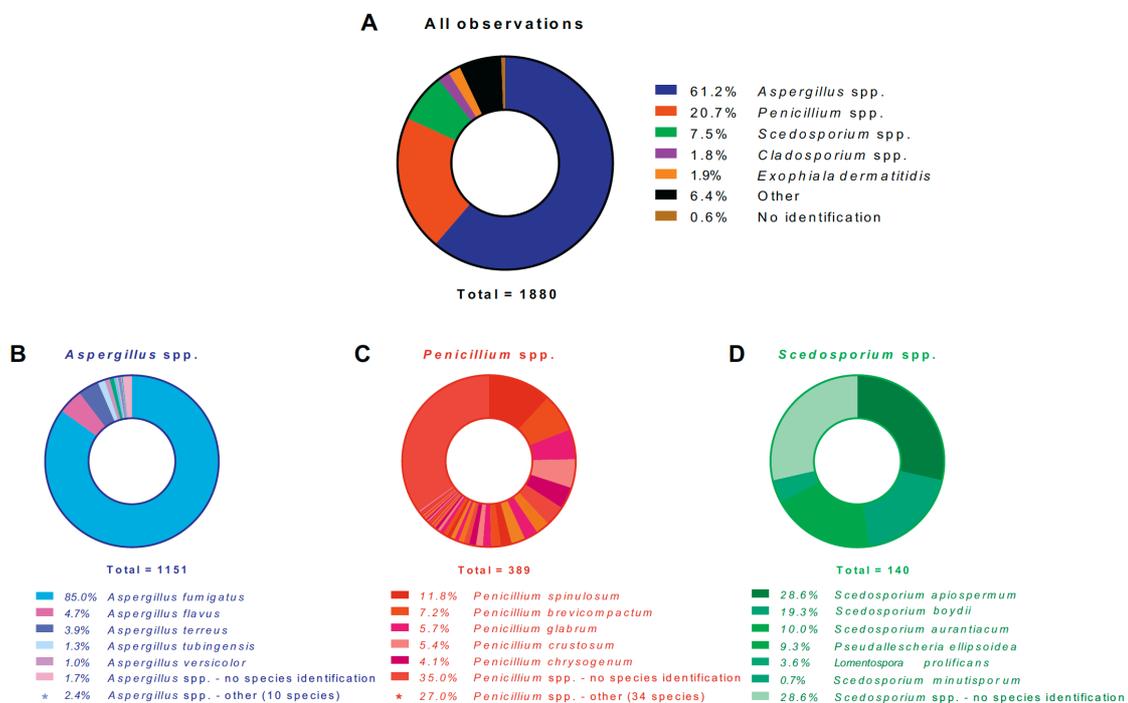


Figura 4.4. Composizione relativa delle specie fungine filamentose identificate nelle vie aeree dei pazienti affetti da FC di un'ampia casistica dei Paesi Bassi. Dati raccolti prospetticamente, in un arco temporale di 3 anni, da una popolazione di 699 pazienti e da un totale di 3787 colture fungine (da: 93).

L'isolamento di *Scedosporium* spp. – inclusivo della specie *Lomentospora prolificans* (precedentemente nota come *Scedosporium prolificans*) – è stato descritto in una percentuale variabile di casi compresa tra il 2 ed il 17%.^{9, 91 - 94, 108} La specie più frequentemente isolata è rappresentata da *Scedosporium apiospermum*. Sono stati recentemente identificati¹⁰⁸ dei fattori

di rischio associati alla colonizzazione da *Scedosporium* spp., tra i quali: genotipo “severo”, presenza di diabete, uso cronico di antibiotici per via inalatoria e co-infezione respiratoria con *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus* spp. La prevalenza di *Exophiala dermatitidis* e altre *Exophiala* spp. si attesta, in diverse casistiche internazionali, tra l’1 ed il 19%.^{9, 91 - 94, 108} La sua presenza sembra associarsi a fattori quali età più avanzata, sesso femminile, genotipo “severo” e concomitante colonizzazione delle vie aeree da *Aspergillus* spp. Sebbene frequentemente riscontrato in singole casistiche, *Penicillium* spp. solo rarissimamente colonizza in maniera cronica le vie aeree dei pazienti FC: la ripetuta positività nel tempo delle colture su campioni delle vie aeree si presenta con frequenza decisamente inferiore rispetto a quanto non osservato per altre specie di funghi filamentosi (*Aspergillus* e non-*Aspergillus*).⁹³

In assenza di studi appropriatamente disegnati disponibili in letteratura, è tuttora impossibile rispondere con assoluta certezza al quesito circa l’impatto clinico di queste specie fungine sulla storia naturale della malattia polmonare in FC.^{7, 9, 108 - 111} Tuttavia, evidenze limitate, ed in gran parte derivanti da studi retrospettivi¹⁰⁸ e *case series*,¹⁰⁹ suggeriscono un pattern sempre più delineato di patogenicità (figura 4.5) e la possibilità, seppur infrequente, di presentazioni cliniche più o meno invasive, in grado di determinare, a livello individuale, una notevole destabilizzazione del quadro clinico e la necessità di intraprendere percorsi terapeutici impegnativi, per tempo e potenziale tossicità, per il paziente. Va, inoltre, tenuto conto dell’intrinseco profilo di resistenza ai comuni agenti antifungini impiegati nella pratica clinica di alcune di queste specie, in particolare *Lomentospora prolificans*, a potenziale ulteriore complicazione della gestione di queste infezioni.⁹ Lo spettro delle manifestazioni cliniche descritte è ampio, da frequenti riacutizzazioni polmonari, accompagnate o meno dalla comparsa di nuove anomalie radiologiche (per es. impatti mucoidi, nuove bronchiectasie, addensamenti rotondeggianti sub-pleurici), alla formazione di franchi infiltrati pneumonici o

allo sviluppo di veri e propri micetomi¹⁰⁹ (figura 4.6). Non infrequenti sono, infine, manifestazioni di ipersensibilizzazione simil-ABPA.^{7, 15}

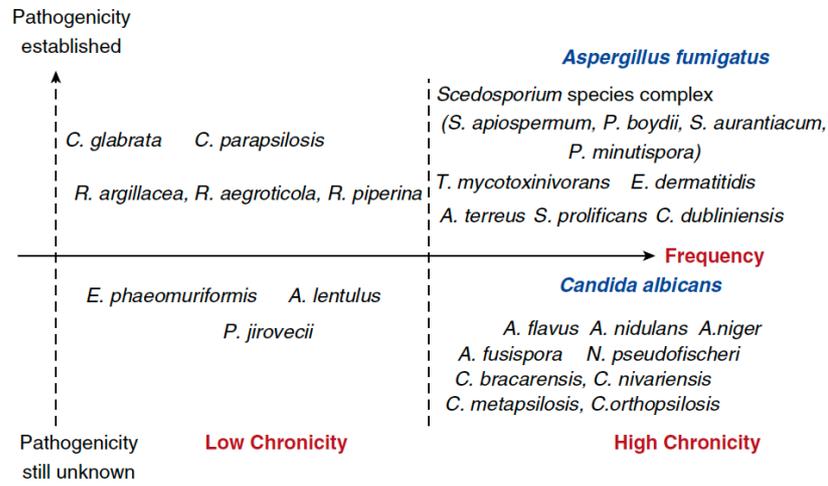


Figura 4.5. Biodiversità delle specie fungine in FC distribuite secondo frequenza di isolamento (asse x) e patogenicità riconosciuta (asse y) (da: 110).

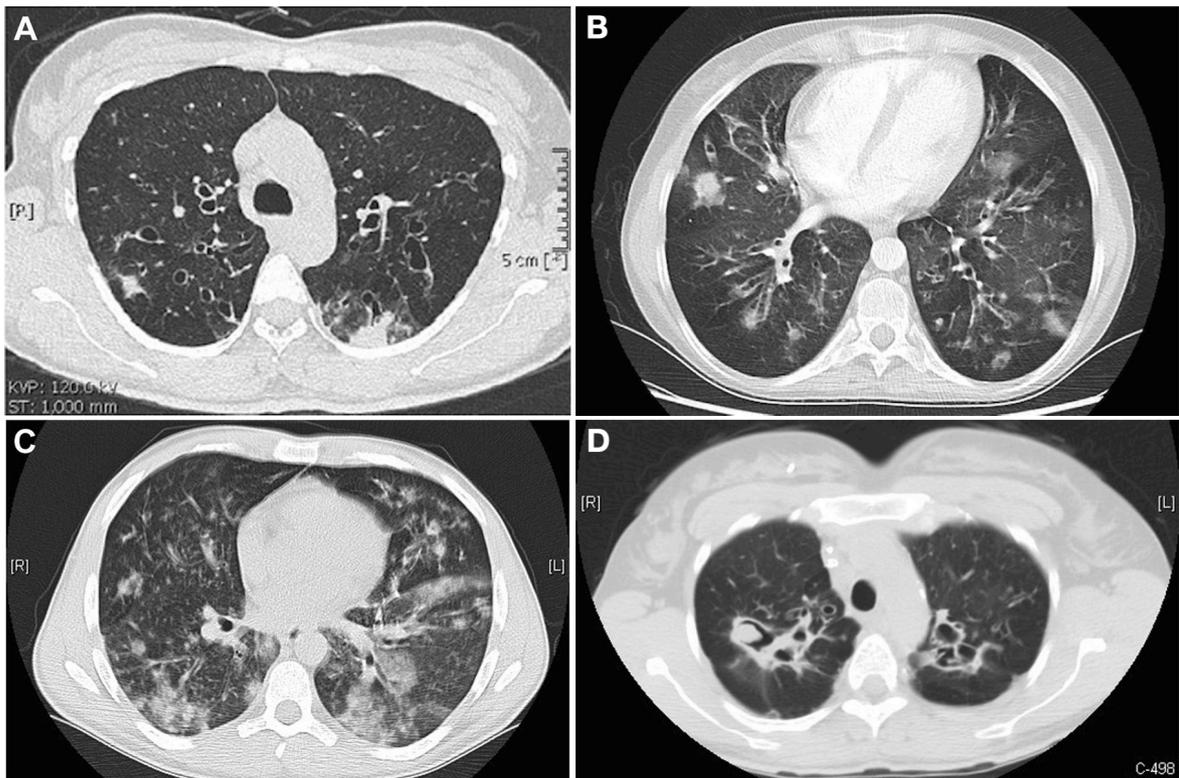


Figura 4.6. Differenti quadri radiologici associati ad infezione polmonare da *Scedosporium apiospermum* in pazienti affetti da FC. A) e B) addensamenti periferici rotondeggianti con bronchiectasie bilaterali; C) multipli infiltrati parenchimali bilaterali; D) *fungus ball* a carico del lobo superiore destro (da: 109).

Per quanto concerne la definizione clinica delle forme invasive di infezioni fungine in FC, sono stati recentemente proposti i seguenti criteri diagnostici:⁹

- 1) aumento dell'espettorato;
- 2) isolamento su più campioni di espettorato e/o liquido di lavaggio broncoalveolare della stessa specie fungina (almeno 2 colture positive in 6 mesi);
- 3) nuovi infiltrati polmonari all'*imaging* (RX o TC);
- 4) fallimento della terapia antibiotica (≥ 2 antibiotici, ≥ 2 settimane di trattamento);
- 5) deterioramento della funzionalità respiratoria (in assenza di altre cause possibili);
- 6) esclusione di altre nuove colonizzazioni/infezioni batteriche (per es. *Pseudomonas aeruginosa*, NTM);
- 7) esclusione di ABPA.

In assenza di criteri diagnostici universalmente riconosciuti e basati sull'evidenza, questi rappresentano ad oggi, anche in virtù dell'*expertise* in materia del gruppo di ricerca tedesco proponente, un valido punto di riferimento nella pratica clinica.

4.2. STANDARDIZZAZIONE DELLE TECNICHE DI COLTURA

Le evidenze disponibili, in progressivo aumento e spesso contraddittorie, riguardo l'epidemiologia e la patogenicità delle specie fungine in FC e la notevole disomogeneità culturale in materia tra i diversi centri di cura,¹¹² così come tra i singoli operatori all'interno degli stessi, rendono estremamente difficile, nella pratica clinica, la gestione dei pazienti con positività dell'espettorato per funghi filamentosi.

Diverse sono le criticità messe in evidenza negli ultimi anni in merito alla gestione delle infezioni fungine in FC,^{10, 113} le quali necessitano di ulteriori ricerche e sforzi da parte della comunità scientifica internazionale al fine di poter rispondere con chiarezza ai numerosi quesiti rimasti ancora irrisolti.¹¹ Tra queste, una delle più rilevanti sia nel campo della ricerca che nella pratica clinica, è rappresentata dall'assenza di tecniche e approcci standardizzati nel trattamento dei campioni provenienti dalle vie aeree per l'isolamento di specie fungine. La presenza e la diffusione di una metodologia universale sono alla base dell'affidabilità e della riproducibilità dei risultati ottenuti nei lavori scientifici, così come nella gestione dei singoli casi individuali nella pratica clinica.

Le metodiche basate sulla coltura sono il mezzo principalmente impiegato nella diagnostica delle infezioni fungine. Nonostante il ragionevole contributo di numerosi fattori geografici (climatici e ambientali), socioeconomici e demografici, è ormai accertato come l'estrema variabilità epidemiologica riportata in letteratura per ciascuna delle specie fungine isolate in FC tragga origine in primis dalla disomogeneità delle tecniche di coltura impiegate nei diversi laboratori.

Diversi studi negli ultimi anni hanno certificato un'evidente sottostima della prevalenza di specie fungine da parte di metodiche colturali impiegate routinariamente, ma non sufficientemente adeguate, in diverse casistiche europee e americane.^{12, 13, 18, 94, 95, 114 - 118} Il tipo ed il volume del campione biologico messo in coltura, la preparazione del campione, l'impiego di terreni di coltura selettivi (per es. Sabouraud destrosio agar o YPDA) o meno, il numero e il tipo dei mezzi di coltura impiegati, i tempi (figura 4.7) e le temperature di incubazione, sono tutti fattori determinanti la sensibilità diagnostica finale della procedura.¹¹³ Inoltre, differenze culturali dei singoli centri di cura sono alla base di enormi disomogeneità nel *timing* di ricerca

di funghi filamentosi nelle vie aeree dei pazienti (ricerca basata sul sospetto clinico vs sorveglianza sistematica e frequenza della stessa).¹⁰

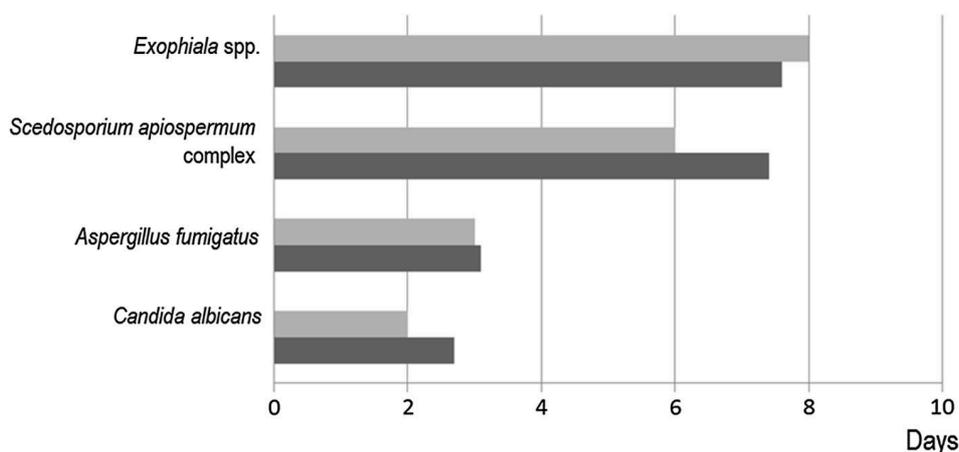


Figura 4.7. Mediane (barre chiare) e medie (barre scure) dei tempi di incubazione necessari per la crescita delle diverse specie fungine nello studio MucoFong (da: 12).

Le peculiari caratteristiche dell'espettorato dei pazienti affetti da FC – in particolare, l'elevata viscosità delle secrezioni – pongono delle sfide uniche dal punto di vista laboratoristico. L'impiego di processi quali omogeneizzazione, sonicazione e diluizione possono rivelarsi utili nell'aumentare significativamente la sensibilità diagnostica verso l'isolamento di specie fungine, come dimostrato da Masoud-Landgraf et al.¹¹⁶

L'importanza del ricorso a terreni di crescita selettivi è stata evidenziata da diversi studi recenti. Nel loro lavoro su una casistica nord-irlandese di 77 pazienti FC, Nagano et al.¹¹⁵ hanno evidenziato come il concomitante sviluppo di colonie batteriche a rapida crescita inibisca la proliferazione delle specie fungine, riducendone significativamente la capacità di isolamento dall'espettorato rispetto a tecniche di coltura basate su terreni di crescita selettivi trattati con supplementazione antibiotica. Risultati analoghi sono stati ottenuti in uno studio di coorte negli USA, in cui, su un totale di 184 campioni di espettorato risultati positivi per uno tra *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp., *Exophiala* spp. e *Trichosporon* spp., la sensibilità aumentava

dal 26% dei terreni di crescita per batteri a circa il 65% per tre diversi tipi di terreni di crescita selettivi per funghi.¹¹⁸ L'arricchimento dei terreni di crescita con agenti antibiotici, quali per esempio cloramfenicolo e gentamicina, è quindi fortemente raccomandato nei campioni delle vie aeree dei pazienti con FC, soprattutto se si tiene in considerazione la pressoché certa positività contemporanea per una o più specie batteriche patogene.

Tentativi di standardizzazione delle procedure di coltura fungina in FC sono stati descritti in due grandi studi prospettici multicentrici internazionali organizzati dal Fri-CF (Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis) working group creato dalla European Confederation of Medical Mycology (ECMM) e dalla International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), in collaborazione con la European Cystic Fibrosis Society (ECFS). I due studi hanno coinvolto, rispettivamente, 7 centri di cura francesi (MucoFong Program)¹² e 19 diversi laboratori tra Francia, Italia, Spagna, Belgio, Regno Unito, Austria, Grecia e Australia (MucoFong International Project, MFIP).¹³ Omogeneizzazione e digestione dei campioni, inoculazione in parallelo su 6 diversi terreni di coltura selettivi (figura 4.8) posti in incubazione fino a 3 settimane di tempo costituiscono il metodo chiave del protocollo MucoFong. I risultati dello studio MFIP hanno permesso di ottenere, attraverso un metodo standardizzato, dati finalmente affidabili circa la prevalenza e la distribuzione geografica (figura 4.9) delle singole specie fungine in FC, con interessanti gradienti di localizzazione evidenziati per specie quali *Aspergillus* sezione Fumigati e per *Scedosporium/Lomentospora* spp.

I risultati degli studi MucoFong e MFIP hanno consentito, inoltre, ai rispettivi autori di sviluppare e suggerire una procedura semplificata *evidence-based* affidabile nella diagnostica colturale fungina nella popolazione FC, che necessiterà di ulteriori studi di valutazione. Approcci di questo tipo sono sempre più fortemente auspicabili, nella speranza di poter porre le basi per lo sviluppo di specifiche linee guida internazionali che definiscano una metodologia

diagnostica affidabile per la pratica clinica e basata sull'evidenza scientifica nel contesto specifico della FC.

Medium	Composition, characteristics	Incubation temperature	Specificities
Chromogenic medium [CAN37]	Medium based on <i>Candida</i> hydrolysis of chromogenic substrates, when incubated at 37 °C. The specific hydrolysis of the hexosaminidase chromogenic substrate allows direct identification of <i>Candida albicans</i> while the hydrolysis of other substrates only provides presumptive species identification for other yeasts including <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitanae</i> or <i>C. kefyr</i>	37 °C	Yeast isolation and identification—two brands were used according to centers' practices: chromID™ <i>Candida</i> agar (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) or BBL™ CHROMagar™ <i>Candida</i> (BD Diagnostics, Le Pont de Claix, France)
Sabouraud + chloramphenicol + gentamicin [SAB27]	Conventional medium used to detect filamentous fungi, especially <i>Aspergillus</i> species. Since molds are environmental fungi, the chosen incubation temperature was 20–27 °C to facilitate growth	20–27 °C	Filamentous fungi, especially <i>A. fumigatus</i>
YPDA or Sabouraud + chloramphenicol and cycloheximide [ACT37]	Media containing 0.5 g/l chloramphenicol and 0.5 g/l cycloheximide and therefore allowing the isolation of slow-growing molds fungi such as dermatophytes	37 °C	Filamentous fungi, especially species of the <i>S. apiospermum</i> complex—due to the presence of cycloheximide, this medium inhibits growth of the aspergilla, thus facilitating the detection of <i>Scedosporium</i> species
Dichloran–rose bengal–chloramphenicol agar supplemented with benomyl [BENO37]	This in-house prepared medium comprises (in g/L): dichloran–rose bengal agar base, 31.5; chloramphenicol, 0.5; glucose, 10; and benomyl 0.008	37 °C	Facilitation of the detection of slow-growing filamentous fungi
Erythritol-enriched medium [ERY27, ERY37]	This in-house prepared medium is made up of (in g/L): yeast nitrogen base, 6.7; agar, 25; meso-erythritol, 10; and chloramphenicol, 0.5	20–27 and 37 °C	Isolation of <i>Exophiala dermatitidis</i> based on its ability to use erythritol as substrate

Figura 4.8. Composizione, caratteristiche e temperature d'incubazione dei sei diversi terreni di crescita selettivi impiegati nel progetto MucoFong. YPDA: estratto di lievito peptone destrosio (da: 12).

Species	Paediatric population (<15 y.o.)		Adult population (≥15 y.o.)		p value	Species	Latitude coordinate of MFIP centers			p value
	Isolates	Prevalence	Isolates	Prevalence			>50°	49–45°	44–40°	
<i>Exophiala</i> sp.	2	2%	14	4%	NS	<i>Candida albicans</i>	55.6%	54.0%	37.4%	0.0024
<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	16	16%	134	38%	<0.001	<i>Candida dubliniensis</i>	11.1%	4.4%	1.5%	0.0107
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	1	1%	13	3.7%	NS	<i>Candida glabrata</i>	8.3%	6.0%	0.7%	0.0101
<i>Aspergillus</i> section <i>Nidulantes</i>	1	1%	12	3.4%	NS	<i>Candida parapsilosis</i>	1.4%	4.8%	6.1%	NS
<i>Aspergillus</i> sp.	3	3%	9	2.5%	NS	Other <i>Candida</i> species	11.1%	3.6%	16.0%	<0.0001
Species belonging to <i>S. apiospermum</i> complex	1	1%	22	6.2%	0.037	<i>Geotrichum</i> sp.	5.6%	0.8%	0.8%	0.0194
Other <i>Scedosporium</i> species plus <i>Lomentospora prolificans</i>	3	3%	16	4.5%	NS	<i>Exophiala</i> sp.	5.6%	4.4%	0.8%	NS
<i>Rasamsonia argillacea</i> species complex	0	0%	5	1.4%	NS	<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	43.1%	34.0%	26.7%	0.0479
<i>Penicillium</i> sp.	4	4%	39	11.1%	NS	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	2.8%	1.6%	6.1%	NS
<i>Cladosporium</i> sp.	1	1%	8	2.3%	NS	<i>Aspergillus</i> section <i>Nidulantes</i>	0%	3.6%	3.1%	NS
Other filamentous fungi	1	1%	18	5.1%	NS	<i>Aspergillus</i> sp.	1.4%	2.0%	4.6%	NS
						Species belonging to <i>S. apiospermum</i> complex	1.4%	2.0%	14.0%	<0.0001
						Other <i>Scedosporium</i> species plus <i>Lomentospora prolificans</i>	2.8%	7.2%	16.8%	0.0019
						<i>Rasamsonia argillacea</i> species complex	0%	0.8%	2.3%	NS
						<i>Penicillium</i> sp.	19.4%	10.4%	2.3%	<0.0001
						<i>Cladosporium</i> sp.	5.6%	2.0%	0%	0.0202
						Other filamentous fungi	11.1%	2.8%	3.1%	0.0126

Figura 4.9. Prevalenza per età (sinistra) e per distribuzione geografica (destra) delle singole specie fungine isolate nello studio MFIP. Totale campioni esaminati: N = 469; totale pazienti reclutati: N = 469. NB: la distribuzione geografica è riferita alla latitudine dell'emisfero boreale dei soli centri europei partecipanti allo studio (modificata da: 13).

4.3. FARMACOCINETICA E MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEGLI AZOLI

I triazoli costituiscono, insieme a polieni ed echinocandine, una delle tre classi di agenti terapeutici disponibili ad azione antifungina. In virtù dell'esteso spettro di azione, della confermata efficacia terapeutica e della disponibilità di diverse formulazioni (orali e parenterali), rappresentano ad oggi gli agenti routinariamente impiegati quale prima scelta in un'ampia gamma di patologie fungine, in particolare nelle infezioni da *Aspergillus*.^{20, 119, 120}

Cinque sono gli azoli al momento disponibili ed il cui uso è autorizzato dalle principali agenzie del farmaco internazionali nel trattamento delle infezioni fungine: fluconazolo, itraconazolo, voriconazolo, posaconazolo ed isavuconazolo. Ad eccezione del fluconazolo, attivo contro i lieviti ma non attivo sulle muffe, i rimanenti membri della classe dei triazoli sono tutti caratterizzati da un ampio spettro d'azione nei confronti di diverse specie fungine filamentose. Il loro effetto è dovuto primariamente all'inibizione del Cyp51, proteina facente parte della famiglia del citocromo P450 che, fungendo da lanosterolo 14- α -demetilasi, impedisce la formazione dell'ergosterolo, componente essenziale della parete cellulare di diverse specie fungine.²¹ L'intera classe degli azoli è caratterizzata da una farmacocinetica complessa,^{19, 20} con interazioni farmacologiche rilevanti - in particolare a causa dell'effetto inibitore sul CYP3A4 - e frequenti fenomeni di tossicità che ne complicano facilmente l'impiego nella pratica clinica.

L'itraconazolo, esistente in una doppia formulazione orale (in capsule e in soluzione), così come in preparazione ad uso endovenoso, è caratterizzato da una biodisponibilità assolutamente variabile tra il 50 - 75%, con la soluzione orale che mostra valori di biodisponibilità maggiori del 25 - 30% rispetto alla formulazione in compresse, a discapito, tuttavia, di una scarsa palatabilità che spesso ne inficia la compliance. A differenza di

quest'ultima, la biodisponibilità della formulazione in compresse dipende dal pH gastrico, con livelli di assorbimento maggiori osservati se assunto durante i pasti e in ambiente acido. Il voriconazolo – anch'esso disponibile in tre diverse formulazioni – invece, ha una biodisponibilità orale > 95%, sovrapponibile per compresse o sospensione orale e indipendente dall'acidità gastrica. Tuttavia, la sua farmacocinetica è non lineare (Michaelis e Menten), secondaria a saturazione dei meccanismi di clearance, e, pertanto, le concentrazioni ematiche dopo aggiustamenti posologici sono del tutto imprevedibili. Il posaconazolo – disponibile in compresse a rilascio prolungato, sospensione orale e formulazione per uso endovenoso – presenta, in modo simile a quanto osservato per l'itraconazolo, un assorbimento intestinale variabile con significative interferenze da parte dell'acidità gastrica e concomitante ingestione di alimenti, soprattutto se ad elevata quantità di grassi. Infine, l'isavuconazolo, l'ultimo degli azoli ad essere stato sviluppato e messo in commercio, è disponibile in capsule o soluzione ad uso endovenoso, e presenta una biodisponibilità orale prossima al 100%, indipendentemente dal pH gastrico. A differenza di itraconazolo, voriconazolo e posaconazolo, la formulazione endovenosa dell'isavuconazolo non presenta eccipienti a base di β -ciclodestrina, che può accumularsi a livello sistemico in condizioni di ridotta funzionalità renale.^{19, 20} A rendere ancora più complesso lo scenario, va ricordato come il paziente affetto da FC possa presentare, nel contesto dell'estrema variabilità fenotipica della malattia, una o più condizioni in grado di interferire significativamente con la farmacocinetica degli azoli^{19, 121} -¹²³ (figura 4.10).

Lo studio della farmacocinetica è strettamente interconnesso con il monitoraggio terapeutico farmacologico (*therapeutic drug monitoring*, TDM) nella pratica clinica. Il regolare ricorso al TDM consente di minimizzare la tossicità e gli eventi avversi, monitorizzare le concentrazioni plasmatiche di farmaci con farmacocinetica imprevedibile e ottimizzarne la posologia al fine

di garantire il successo terapeutico (figura 4.11). Con le premesse di cui sopra, è facile comprendere come sia ormai universalmente riconosciuto quale fondamentale il ruolo del TDM degli azoli nella gestione clinica delle infezioni fungine. Apposite linee guida internazionali^{20, 119, 120} sono state pubblicate negli ultimi anni, a dimostrazione di una sempre maggiore attenzione rivolta in merito da parte della comunità scientifica.

Pathological changes in cystic fibrosis	Potential effect on azole pharmacokinetics
Pancreatic insufficiency and fat malabsorption	Decreased absorption of triazoles requiring fatty meals for optimal absorption, such as itraconazole and posaconazole. Studies to date have shown intact bioavailability but delayed absorption
Gastric and duodenal acid hypersecretion	Itraconazole capsules require an acidic environment for better absorption. Absorption rate could theoretically be increased in CF patients
Increased intestinal permeability	None
Increased total body volume	Voriconazole exhibited a higher volume of distribution in CF patients, potentially requiring increased weight-based dosing regimens
Hypoalbuminemia	Potential increase in free drug levels of triazoles that are highly protein bound, such as itraconazole, posaconazole and isavuconazole
Hepatobiliary dysfunction	Theoretical decrease in drug metabolism
Increased renal and hepatic clearance	Weight normalized posaconazole clearance was higher in CF patients

Figura 4.10. Effetti teorici ed attesi della Fibrosi Cistica sulla farmacocinetica degli azoli (da: 19).

Specifici livelli plasmatici minimi efficaci sono indicati per i singoli membri della classe degli azoli, in alcuni casi con target differenti a seconda che il trattamento farmacologico in atto sia a scopo terapeutico o profilattico, della severità dell'infezione, dell'eventuale resistenza ad azoli da parte del patogeno e della tecnica di laboratorio utilizzata per la determinazione dei livelli plasmatici stessi (per es. cromatografia liquida ad alta prestazione, HPLC; spettrometria di massa, ecc.). Verranno di seguito indicati i valori raccomandati di TDM per le misurazioni effettuate mediante HPLC. Il TDM dovrebbe sempre effettuato al raggiungimento dello steady state (figura 4.12).

Nei pazienti in terapia con itraconazolo è sempre raccomandato il monitoraggio terapeutico, con target di livelli plasmatici minimi > 0.5 mg/l, sia per quanto riguarda il suo impiego a

scopo profilattico che terapeutico, sebbene in quest'ultimo caso siano preferibili valori > 1 mg/l.^{20, 119} Il TDM dovrebbe essere effettuato tra il 5° - 7° giorno dall'inizio della terapia e, successivamente, in base all'insorgenza di condizioni che possano modificare assorbimento e/o clearance dell'itraconazolo o in caso di sospetta tossicità. Quest'ultima si riscontra solitamente per valori plasmatici $> \sim 4$ mg/l.¹¹⁹

Clinical Scenarios Where Antifungal Therapeutic Drug Monitoring Is Useful	Examples, Comment
Populations with increased pharmacokinetic variability	Impaired gastrointestinal function; hepatic (voriconazole, posaconazole, itraconazole); pediatric patients, elderly patients, obese patients, critically ill patients
Changing pharmacokinetics	Intravenous-to-oral switch, changing GI function, changing hepatic or renal function, physiological instability
Interacting medications	Patient receiving medication that induces CYP3A4, antacids, proton pump inhibitors (itraconazole capsules, posaconazole suspension), antiretroviral medications Possibly corticosteroids (voriconazole)
Severe disease	Extensive infection, lesions contiguous with critical structures, CNS infection, multifocal or disseminated infection
Compliance	Important issue with longer-term consolidation therapy or secondary prophylaxis
Suspected breakthrough infection	TDM can help to establish whether fungal disease progression occurred in the setting of inadequate antifungal exposure
Suspected drug toxicity, especially neurotoxicity (voriconazole)	Although exposure-response relationships are described for other toxicities (eg, hepatotoxicity, bone disease), the utility of TDM to prevent their occurrence is less well established

Figura 4.11. Scenari clinici di riconosciuta utilità del TDM degli azoli in corso di infezioni fungine. GI: gastrointestinal; CNS: central nervous system (da: 120).

Anche per il voriconazolo è sempre raccomandato il ricorso a regolare TDM, con livelli plasmatici minimi > 1 mg/l, sia in regime di profilassi che di terapia.^{20, 119} Anche in questo caso, tuttavia, sono consigliati target superiori (> 2 mg/l) in caso di infezioni severe disseminate o di ceppi con ridotta sensibilità antifungina (concentrazione minima inibitoria, MIC > 1 mg/l), con una finestra terapeutica inclusa entro i 4 - 6 mg/l²⁰ (o 5.5 mg/l)¹¹⁹ per evitare fenomeni di tossicità, di frequente riscontro nella pratica clinica. Il TDM andrebbe eseguito a 2 - 5 giorni dall'inizio della terapia e nella settimana successiva.

In corso di terapia con posaconazolo, il monitoraggio terapeutico è raccomandato soprattutto in caso di terapia con sospensione orale; formulazioni in compresse e ad uso parenterale hanno una cinetica più prevedibile e pertanto potrebbero non richiedere TDM di routine, seppure quest'ultimo possa rivelarsi utile in caso di sospetta tossicità, scarsa compliance, fallimento

terapeutico e infezione da specie scarsamente sensibili. Valori target > 0.7 mg/l (o, in alternativa, 0.35 mg/l dopo 48 h dall'inizio del trattamento) e > 1 mg/l sono raccomandati,^{20, 119} rispettivamente, nel caso di profilassi e terapia antifungina con posaconazolo. Il dosaggio plasmatico andrebbe effettuato tra i 5 - 7 giorni successivi all'inizio della terapia. Seppur in assenza di raccomandazioni specifiche, è consigliata, quale limite superiore di sicurezza, una concentrazione pari a 3.75 mg/l.¹¹⁹

Infine, l'isavuconazolo è l'unico dei quattro azoli (oltre al fluconazolo) che non richiede monitoraggio terapeutico in virtù delle sue proprietà farmacocinetiche.¹⁹ Ciononostante, pur non esistendo una finestra terapeutica ben definita, se ne suggerisce una concentrazione plasmatica compresa tra 2 - 3 mg/L a partire dal quinto giorno di terapia.¹¹⁹

Agent	Prophylaxis	Treatment	Timing	Recommended ranges
Itraconazole	Y	Y	5-7 days after initiation of therapy or following dose adjustment	Trough concentration >0.5 mg/L
Voriconazole	Y	Y	Within 5 days of initiation, following dose adjustment or starting or stopping interacting medications	Trough concentration >1 mg/L; Trough concentrations >4-6 mg/mL associated with toxicity
Posaconazole	Y	Y	7 days after initiation of therapy, following dose adjustment, uncertain compliance, interacting medications	Trough concentration >0.7 mg/L at steady state or 0.35 mg/L 48 h after initiation of therapy for prophylaxis Target of treatment is >1 mg/L

Figura 4.12. Riassunto schematico delle raccomandazioni per il TDM di itraconazolo, voriconazolo e posaconazolo. L'isavuconazolo non richiede TDM di routine (modificata da: 19).

4.4. RESISTENZA AGLI AZOLI

Negli ultimi 20 anni, è stata descritto con sempre maggiore frequenza il riscontro di specie fungine con resistenza agli azoli. L'attenzione della letteratura scientifica si è focalizzata in particolar modo sui ceppi di *Aspergillus fumigatus* resistenti agli azoli (ARAF). Nel 2020 sono stati pubblicati dalla European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

(EUCAST) i *breakpoints* aggiornati per l'interpretazione delle MIC nella definizione delle resistenze agli azoli di alcune tra le principali specie di *Aspergillus*^{124, 125} (figura 4.13).

	Itraconazole (mg/L)				Posaconazole (mg/L)			
	WT (ECOFF) ≤	S ≤	R >	ATU	WT (ECOFF) ≤	S ≤	R >	ATU
<i>A. flavus</i>	1	1	1	2	0.5	ND	ND	ND
<i>A. fumigatus</i>	1	1	1	2	0.25	0.125	0.25	0.25
<i>A. nidulans</i>	1	1	1	2	0.5	ND	ND	ND
<i>A. niger</i>	4	ND	ND	ND	0.5	ND	ND	ND
<i>A. terreus</i>	0.5	1	1	2	0.25	0.125	0.25	0.25
	Voriconazole (mg/L)				Isavuconazole (mg/L)			
	WT (ECOFF) ≤	S ≤	R >	ATU	WT (ECOFF) ≤	S ≤	R >	ATU
<i>A. flavus</i>	2	ND	ND	ND	2	1	2	2
<i>A. fumigatus</i>	1	1	1	2	2	1	2	2
<i>A. nidulans</i>	1	1	1	2	0.25	0.25	0.25	ND
<i>A. niger</i>	2	ND	ND	ND	4	ND	ND	ND
<i>A. terreus</i>	2	ND	ND	ND	1	1	2	ND

Figura 4.13. Cut-off epidemiologici e *breakpoints* clinici di sensibilità e resistenza per *Aspergillus* spp. pubblicati dall'EUCAST nella versione 10.0 del 2020. WT: wild-type; ECOFF: epidemiological cut-off value; S: susceptible; R: resistant; ATU: area of technical uncertainty; ND: not defined (da: 125).

Il primo isolamento di un ceppo ARAf fu descritto nel 1997 da una casistica californiana in terapia prolungata con itraconazolo.¹²⁶ Da allora, sempre più casistiche analoghe sono state descritte da tutto il mondo. Due sono le potenziali vie riconosciute di sviluppo di resistenza da parte di ARAf: la cosiddetta via *de novo* (o “del paziente”), secondaria all'esposizione a lungo termine agli azoli in corso di trattamenti farmacologici prolungati, e la via ambientale, legata al sempre più diffuso impiego di prodotti fungicidi, in particolare nel settore agricolo.²¹

Il più frequente meccanismo di acquisizione di resistenza agli azoli nella via *de novo* è rappresentato da mutazioni puntiformi nel gene *cyp51A*, determinanti una riduzione dell'affinità degli azoli per la proteina Cyp51, bersaglio terapeutico dell'intera classe di farmaci. In particolare, le mutazioni più frequentemente riscontrate interessano i codoni 54, 138, 220, 431, 434 e 448²¹ (figura 4.14). Le diverse mutazioni a carico del gene *cyp51A* possono

determinare l'insorgenza di diversi pattern di cross-resistenza tra azoli:²² per esempio, le mutazioni G138R e G448S sono state associate ad elevate MIC per itraconazolo e voriconazolo, così come le mutazioni G138C, M220K e M220T conferiscono tipicamente una resistenza multi-agente verso itra-, voriconazolo.²¹ Casi di ARAf sono stati descritti anche tra ceppi privi di mutazioni del *cyp51A*. In questi casi, i meccanismi più comunemente chiamati in causa sono rappresentati dalla *upregulation* farmaco-indotta dei geni codificanti per i cosiddetti trasportatori di efflusso della resistenza multifarmaco (MDR), che includono le superfamiglie del *major facilitator* (MFS) e della *ATP-binding cassette* (ABC).^{21, 22}

De novo (patient) route			Environmental route		
Gene	Tandem repeats	Amino acid substitution	Gene	Tandem repeats	Amino acid substitution
<i>cyp51A</i>	-	G54E, V, or R	<i>cyp51A</i>	-	G54E, A, or R
	-	G138C		TR ₃₄	L98H
	-	H147Y		TR ₃₄	L98H/S297T/F495I
	-	P216L		TR ₄₆	Y121F/T289A
	-	M220K, or T		TR ₄₆	Y121F/M172I/T289A/G448S
	-	H285Y		TR ₅₃	-
	-	Y431C			
	-	G432S			
	-	G434C			
	-	G448S			
	TR ₁₂₀				
<i>hapE</i>	-	P88L			
<i>hmg1</i>	-	S269F			
<i>mdr1</i>	-	- ^a			
<i>mdr2</i>	-	- ^a			
<i>mdr3</i>	-	- ^a			
<i>mdr4</i>	-	- ^a			

Figura 4.14. Mutazioni e meccanismi genetici più frequentemente implicati nello sviluppo di ARAf: a: sovraespressione genica (da: 21).

I ceppi di ARAf di origine ambientale derivano, invece, dalle forti pressioni selettive esercitate dall'impiego di fungicidi ad uso ambientale - quali propiconazolo, tebuconazolo,

eoposiconazolo, difenoconazolo e bromuconazolo – che condividono caratteristiche strutturali e bersaglio molecolare con gli azoli a impiego clinico. I ceppi ambientali di ARAf possiedono classicamente ripetizioni in tandem (TR) del promotore del gene *cyp51A*, con risultante sovraespressione genica. Le TR più frequentemente isolate sono costituite da sequenze di 34 (TR₃₄), 46 (TR₄₆) o 53 (TR₅₃) coppie di basi, cui si associano tipicamente mutazioni puntiformi nella regione codificante del gene (per es. TR₃₄/L98H o TR₄₆/Y121F/T289A). Queste ultime, tuttavia, non sono ancora state riscontrate negli isolati con TR₅₃.²¹ Soltanto in rari casi sono stati identificati ceppi ambientali di ARAf con mutazioni isolate del *cyp51A* (G54E, A o R; M220I) esenti da concomitanti TR del promotore.^{127 - 129} Solitamente, i ceppi di ARAf a resistenza acquisita per via ambientale vengono riscontrati in pazienti *naïve* da terapia antifungina e presentano una diversità genetica interindividuale limitata rispetto a quanto non osservato per i ceppi con resistenza *de novo*.¹³⁰ Inoltre, questi ultimi sembrano mostrare, come frutto dell'evoluzione genetica, anomalie nella morfologia della crescita in colonie, ridotta capacità di sporulazione e ridotti tassi di crescita, che sembrano comprometterne la competitività e la sopravvivenza ambientale in contesti *azole-free*,¹³⁰ a differenza di quanto non accada per i ceppi a origine ambientale.¹³¹ Questo spiega, insieme alla capacità intrinseca delle spore di disperdersi potendo coprire anche aree di migliaia di chilometri nell'aria,¹³² la notevole capacità di questi ultimi di diffondersi a livello globale osservata nelle ultime 2 decadi (figura 4.15).

L'Europa rappresenta senza dubbio il continente con le percentuali di ARAf più elevate riportate fino ad oggi (figura 4.16). I primi report pubblicati nei primi anni 2000 riguardavano casistiche di Paesi Bassi e Regno Unito.^{22, 132} Da allora, casistiche sempre più ricche per numero di isolati e variabilità delle mutazioni responsabili sono state pubblicate da pressoché tutti principali Paesi europei, tra cui anche l'Italia.¹²⁹

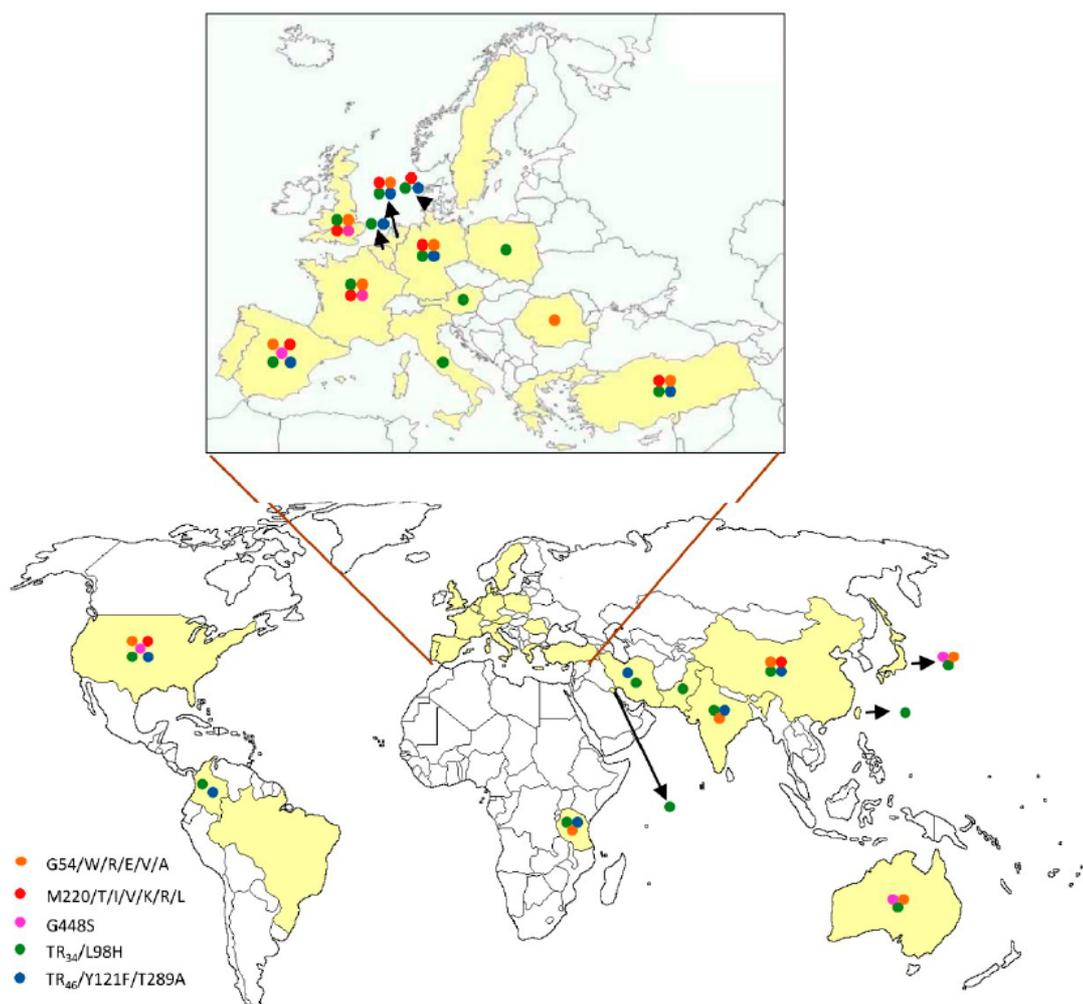


Figura 4.15. Distribuzione globale di *Aspergillus fumigatus* resistente ad azoli e mutazioni di maggiore riscontro per area geografica (da: 22).

Continent/Country	% Resistance	Source of the Isolates
Europe		
Belgium	5.7	C
France	0.85–10.6	C
Germany	1.1–12	C and E
Netherlands	2.1–20	C and E
Poland	2.25	C
Spain	1.8	C
Turkey	10.2	C
United Kingdom	6.6–28	C
Other continents		
Asia *	1.9–11.1	C and E
Africa (Tanzania)	13.9	E
America (USA)	0.6–11.8	C
Oceania (Australia)	2.6	C

Figura 4.16. Prevalenza Paese-specifica di *Aspergillus fumigatus* resistente ad azoli. C: ceppi clinici (*de novo*); E: ceppi ambientali; *inclusi Cina, Giappone, Kuwait, India, Iran e Pakistan (modificata da: 22).

Nello specifico contesto della FC, la prevalenza di ceppi di ARAf è stata finora oggetto di pochi studi,²³ nonostante, come già visto in precedenza, *Aspergillus fumigatus* rappresenti un patogeno di frequente riscontro ed il conseguente comune utilizzo di prolungate terapie con azoli in questa popolazione. Ad oggi, 8 sono infatti gli studi pubblicati che descrivono la prevalenza di ARAf in FC e, sorprendentemente, sono tutti stati condotti in Europa.^{24, 133 - 139} Gli studi in questione sono molto disomogenei tra loro e differiscono per una serie di caratteristiche, tra cui criteri di inclusione, specifiche demografiche, disegno e durata dello studio, impiego locale di profilassi antifungina o meno, metodiche utilizzate per l'analisi della suscettibilità antibiotica e tecniche di coltura fungina. I risultati sono, pertanto, difficilmente confrontabili. La prevalenza descritta è compresa tra il 3.4 e l'8%, con un'unica preoccupante eccezione riportata nella casistica londinese di Abdolrasouli et al.²⁴ in cui viene riportata una prevalenza del 16.2%. Una pregressa esposizione ad azoli tra i pazienti colonizzati da ARAf è stata descritta per la maggioranza dei partecipanti di 3 dei suddetti studi (83.3 - 100%),^{135 - 137} ma non negli studi di Fischer et al.¹³⁴ e Seufert et al.,¹³⁹ in cui, rispettivamente, il 25% ed il 45% dei pazienti colonizzati risultava aver ricevuto un precedente trattamento con azoli, dato probabilmente influenzato dalle note differenze culturali riscontrate tra i diversi centri e Paesi nella gestione della terapia antifungina. La mutazione più frequentemente riscontrata è stata la TR34/L98H, seguita da mutazioni puntiformi del codone 220, quest'ultime, come evidenziato in precedenza, tipicamente associate a meccanismi di acquisizione di resistenza *de novo*.

A differenza di quanto detto per *Aspergillus fumigatus*, di gran lunga minore è la letteratura a disposizione per quel che riguarda le resistenze agli azoli tra le altre specie di *Aspergillus* e i NAFF. A tale proposito, va sicuramente ricordato il profilo di multi-resistenza intrinseca agli azoli tipico di *Lomentospora prolificans*, a rendere estremamente complicata la gestione terapeutica di questo patogeno.¹¹ Non infrequente, d'altronde, è anche il riscontro di

resistenza agli azoli, in forma singola o combinata, da parte di *Scedosporium apiospermum* complex, in particolare nei confronti di itraconazolo ed isavuconazolo.^{11, 140} *In vitro*, i migliori risultati sono stati ottenuti con voriconazolo e, in minor misura, posaconazolo, giustificando il ricorso al voriconazolo quale agente di prima scelta nei confronti di *Scedosporium* spp. ed il suo migliore profilo di efficacia rispetto a quanto osservato per *Lomentospora prolificans*. Recentemente, inoltre, alcune *case series* hanno messo in luce l'esistenza di ceppi multi-resistenti di *Rasamsonia argillacea* complex in FC, con MIC particolarmente elevate per voriconazolo e, in minor misura, itraconazolo.^{141, 142}

5. SEZIONE SPERIMENTALE

5.1. OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo primario del presente studio è duplice: analizzare i risultati del TDM effettuato nella pratica clinica *real-life* di una popolazione adulta affetta da FC in trattamento con azoli e identificare i fattori di rischio associati al riscontro di livelli plasmatici sub-terapeutici.

L'obiettivo secondario è rappresentato, invece, dall'analisi dello sviluppo di resistenza antifungina all'interno della suddetta popolazione e dei potenziali fattori di rischio, con particolare attenzione rivolta alla patologia fungina sottostante e all'eventuale associazione con il riscontro di livelli plasmatici sub-terapeutici dei triazoli.

5.2. MATERIALI E METODI

5.2.1. Disegno dello studio

Il presente studio è stato effettuato in collaborazione con l'Adult Cystic Fibrosis Centre del Royal Brompton & Harefield National Health Service Foundation Trust (RBHT; Londra, Regno Unito) e con l'Imperial College London (Londra, Regno Unito). Lo studio è stato approvato dalla UK Research Ethics Committee con numero di protocollo 18/HRA/1074.

È stata condotta un'analisi retrospettiva longitudinale sui dati raccolti dai registri elettronici dell'Adult Cystic Fibrosis Centre del RBHT. Sono stati inclusi nello studio tutti i pazienti che rispondevano ai seguenti criteri di inclusione: età ≥ 16 anni, con diagnosi confermata di FC secondo le linee guida internazionali di riferimento⁷², già in terapia o che avessero iniziato terapia con azoli nel periodo compreso tra il 1 gennaio 2018 ed il 31 dicembre 2019, per i

quali fossero state effettuate ≥ 3 colture fungine/anno (di cui almeno una per ciascun anno con test di sensibilità antifungina) su campioni delle vie aeree nel periodo di studio. Sono stati esclusi i pazienti con anamnesi positiva per trapianto polmonare, o sottoposti allo stesso nel periodo di osservazione.

Per ciascun paziente reclutato sono stati raccolti, dalle schede di ciascuna visita effettuata nel periodo di studio, i dati relativi a: caratteristiche demografiche e antropometriche, funzionalità respiratoria, patogeni colonizzatori delle vie aeree, funzione pancreatica, terapia farmacologica in atto, numero di riacutizzazioni polmonari/ricoveri ospedalieri, indicazione all'impiego di terapia antifungina, data di inizio e termine della stessa, posologia ed eventuali aggiustamenti terapeutici, frequenza e risultati del TDM.

Per la definizione delle diverse entità cliniche di malattia polmonare fungina sono stati usati i seguenti criteri:

- ABPA: IgE totali elevate (> 1000 kUI/l), positività per IgE e IgG specifiche anti-*Aspergillus fumigatus*, coltura positiva per *Aspergillus fumigatus*;
- sensibilizzazione ad *Aspergillus*.: IgE totali elevate (ma < 1000 kUI/l); positività per IgE specifiche anti-*Aspergillus fumigatus*, negatività per IgG specifiche anti-*Aspergillus fumigatus*, coltura negativa per *Aspergillus fumigatus*;
- bronchite da *Aspergillus*: IgE totali nella norma e IgE specifiche anti-*Aspergillus fumigatus* negative; IgG specifiche anti-*Aspergillus fumigatus* positive; coltura positiva per *Aspergillus fumigatus*;
- colonizzazione cronica da *Aspergillus*: IgE totali nella norma, IgE e IgG specifiche anti-*Aspergillus fumigatus* negative; coltura positiva per *Aspergillus fumigatus* (≥ 2 colture positive in 6 mesi);

- colonizzazione cronica da NAFF: coltura positiva per NAFF (≥ 2 colture positive in 6 mesi);
- micetoma/aspergillosi cavitaria: coltura fungina positiva (per *Aspergillus* spp. o NAFF) con conferma radiologica mediante TC.

L'interpretazione dei livelli plasmatici degli azoli è stata effettuata secondo i cut-off raccomandati dalle linee guida della British Society for Medical Mycology (BSMM):²⁰ > 0.5 mg/l per itraconazolo, > 1 mg/l per voriconazolo e posaconazolo. Livelli plasmatici sub-terapeutici in cronico sono stati definiti come tali se riscontrati in almeno due differenti TDM, a distanza di almeno due mesi l'uno dall'altro durante il periodo di osservazione.

Tutte le colture fungine sono state effettuate con protocollo standardizzato introdotto, a partire dal 2015, nella routine di laboratorio del RBHT. Caratteristiche principali di tali colture sono rappresentate da (figura 5.1):

- pretrattamento mucolitico con soluzione contenente acido 2,3-diidrossibutandico;
- utilizzo in parallelo di tre differenti terreni di coltura selettivi (due dei quali arricchiti con cloramfenicolo);
- tempi di incubazione fino a quattro settimane.

L'analisi di sensibilità antifungina è stata eseguita mediante metodo di micro-brodo-diluizione e i risultati sono stati interpretati in base ai *breakpoints* EUCAST suggeriti durante il periodo di studio.^{143, 144} Pertanto, per definire sensibilità (S), sensibilità intermedia (I) e resistenza (R) di *Aspergillus fumigatus* sono stati utilizzati i seguenti *breakpoints* della MIC dei singoli azoli:

- itraconazolo: $S \leq 1$ mg/l, 1 mg/l $< I \leq 2$ mg/l, $R > 2$ mg/l;
- voriconazolo: $S \leq 1$ mg/l, 1 mg/l $< I \leq 2$ mg/l, $R > 2$ mg/l;

- posaconazolo: $S \leq 0.125 \text{ mg/l}$, $0.125 \text{ mg/l} < I \leq 0.25 \text{ mg/l}$, $R > 0.25 \text{ mg/l}$;
- isavuconazolo: $S \leq 1 \text{ mg/l}$, $R > 1 \text{ mg/l}$.

Per tutti gli altri isolati per i quali non erano disponibili *breakpoints* della MIC raccomandati da EUCAST (per es. NAFF), sono stati utilizzati cut-off basati su archivi epidemiologici locali.

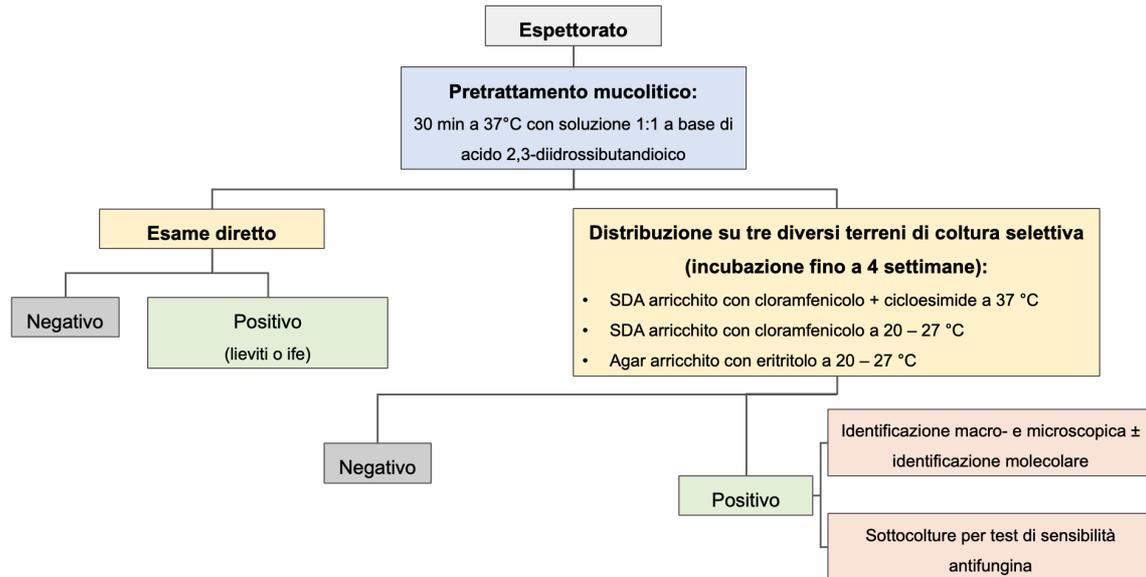


Figura 5.1. Protocollo standardizzato per l'esecuzione delle colture fungine. SDA: Sabouraud destrosio agar.

5.2.2. Analisi statistica

La normalità della distribuzione dei parametri continui è stata valutata con il test di Shapiro-Wilk. Valori a distribuzione normale e non normale sono espressi, rispettivamente, come media \pm deviazione standard (DS) e mediana (range interquartile, IQR).

Per l'analisi dei fattori di rischio associati al riscontro di livelli plasmatici sub-terapeutici è stato elaborato un modello misto lineare generalizzato. I fattori di rischio inclusi nel modello sono stati i seguenti: età, genere, insufficienza pancreatica, azolo in corso, utilizzo di azoli e altre classi di antifungini per via endovenosa, terapia con inibitori di pompa protonica, FEV₁ e FVC

in valore percentuale del predetto. L'analisi è stata effettuata in due step successivi: inizialmente sono state elaborate analisi univariate per selezionare le variabili con P value < 0.2 da inserire nella successiva regressione logistica multivariata.

La probabilità di sviluppare resistenza antifungina nel periodo di monitoraggio è stata valutata mediante regressione univariata di Cox con diagramma di Kaplan-Meier, utilizzando il tipo di patologia fungina come covariata ed il tempo trascorso allo sviluppo di resistenza come outcome. Per effettuare il confronto tra tempo di sviluppo di resistenza antifungina tra pazienti con e senza livelli plasmatici sub-terapeutici di azoli è stato elaborato un modello a quattro stadi che potesse riflettere in maniera opportuna la dinamicità nel tempo dello status di resistenza:

- stadio 1: assenza di crescita fungina;
- stadio 2: positività per specie fungina, analisi di suscettibilità antifungina non effettuata;
- stadio 3: positività per specie fungina sensibile agli azoli;
- stadio 4: positività per specie fungina resistente a uno o più azoli.

Nel modello indicato, i pazienti potevano progredire e retrocedere in maniera dinamica attraverso gli stadi 1 - 3; lo stadio 4 rappresentava, invece, uno stadio terminale.

Infine, è stata effettuata un'analisi di regressione logistica, basata sul solo utilizzo dei casi con positività dell'esame colturale, includendo tipo di azolo impiegato e la rispettiva posologia, per indagare in merito al possibile contributo dei livelli plasmatici al TDM allo sviluppo di resistenza allo stesso azolo in corso di trattamento.

Valori di $P < 0.05$ sono stati considerati come statisticamente significativi. L'analisi dei dati è stata effettuata con il software SPSS Statistics versione 26.0 (IBM, Armonk, New York, USA).

5.3 RISULTATI

5.3.1. Caratteristiche dei partecipanti

Su un totale di 613 pazienti adulti seguiti tra il 2018 ed il 2019 presso l'Adult Cystic Fibrosis Centre del RBHT, sono stati selezionati 91 pazienti (48 M/43 F) in terapia con azoli, rispondenti ai criteri di inclusione. Sono state raccolte le informazioni provenienti da un totale di 1275 visite mediche (tra visite ambulatoriali, day hospital e ricoveri) effettuate nel periodo di studio: la mediana delle visite per ciascun paziente è risultata pari a 22.5 (IQR 18 - 27), con una media di 7.05 visite/anno per paziente. Le caratteristiche di base dei partecipanti sono riassunte nella tabella 5.1.

Oltre la metà dei partecipanti (59.3%) ha ricevuto itraconazolo come terapia di prima linea, con lieve preferenza per la formulazione in capsule (35.1%) rispetto alla soluzione orale (24.2%). L'isavuconazolo non è stato prescritto in nessun caso quale terapia di prima linea, bensì esclusivamente per fallimento della terapia di prima linea. Dei 54 pazienti originariamente trattati con itraconazolo, 8 hanno successivamente dovuto cambiare terapia: 5 a voriconazolo, 7 a posaconazolo e 1 a isavuconazolo; 9 dei 17 pazienti inizialmente trattati con voriconazolo sono successivamente passati a posaconazolo e, infine, 2 dei 20 pazienti trattati con posaconazolo hanno dovuto modificare la terapia a isavuconazolo. Tutti i partecipanti trattati con posaconazolo hanno ricevuto la formulazione in compresse a rilascio prolungato. È stata osservata una durata media del trattamento con azoli di 1013 ± 898 giorni

(range 88 – 3287); 22 pazienti (24.2%) hanno proseguito la terapia antifungina per l'intera durata di 2 anni dello studio.

Tabella 5.1. Caratteristiche demografiche e terapia antifungina della popolazione di studio.

Età, anni	28.0 ± 8.9
Genere, M/F	48 (52.7%) / 43 (47.3%)
BMI, kg/m ²	21.5 (20.3 – 22.7)
ΔF508:	
• omozigosi	29 (31.9%)
• eterozigosi	42 (46.1%)
• assente	20 (22.0%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63 (69.2%)
Insufficienza pancreatica	83 (91.2%)
FEV ₁ , % predetto	51.1 ± 20.3
FVC, % predetto	80.2 ± 14.8
Terapia con IPP	56 (61.5%)
Patologia fungina in trattamento:	
• ABPA	46 (50.5%)
• sensibilizzazione ad <i>Aspergillus</i>	6 (6.6%)
• bronchite da <i>Aspergillus</i>	21 (23.1%)
• colonizzazione cronica da <i>Aspergillus</i>	4 (4.4%)
• micetoma/aspergillosi cavitaria	5 (5.5%)
• colonizzazione cronica da NAFF	9 (9.9%)
Azolo impiegato in prima linea:	
• itraconazolo:	54 (59.3%)
○ capsule	32 (35.1%)
○ soluzione orale	22 (24.2%)
• voriconazolo	17 (18.7%)
• posaconazolo ^a	20 (22.0%)
• isavuconazolo	0

BMI: body mass index; FEV₁: volume espiratorio forzato dopo un secondo; FVC: capacità vitale forzata; IPP: inibitori di pompa protonica; ABPA: aspergillosi broncopolmonare allergica; NAFF: funghi filamentosi non-*Aspergillus*.

a. In tutti i casi esaminati in terapia con posaconazolo è stata prescritta la formulazione in compresse a rilascio prolungato.

5.3.2. TDM e analisi dei fattori di rischio associati al riscontro di livelli sub-terapeutici

Il TDM è stato effettuato in un totale di 323 occasioni, di cui il 46.4% dei casi rappresentati da monitoraggio in corso di terapia con posaconazolo (tabella 5.2). Livelli plasmatici sub-terapeutici in cronico sono stati riscontrati in 49 pazienti (53.8%).

Tabella 5.2. TDM e frequenza di livelli sub-terapeutici per ciascuno dei singoli azoli prescritti.

Farmaco	Totale TDM	Livelli sub-terapeutici	Odds ratio ^a	95% CI
Itraconazolo, s.o.	62	30 (48.4%) ^b	-	-
Itraconazolo, capsule	57	34 (59.6%) ^b	1.58	0.76 - 3.26
Voriconazolo	51	31 (60.8%) ^b	1.65	0.78 - 3.50
Posaconazolo	150	72 (48.0%) ^b	0.98	0.54 - 1.78
Isavuconazolo	3	0	ND	ND

CI: intervallo di confidenza; s.o.: soluzione orale; ND: non disponibile.

a. Riferito al riscontro di livelli plasmatici sub-terapeutici rispetto a itraconazolo in soluzione orale.

b. Percentuale espressa in rapporto al numero di TDM effettuati per il singolo farmaco.

All'analisi univariata (tabella 5.3), il modello misto lineare generalizzato ha evidenziato quali fattori di rischio per il riscontro di livelli sub-terapeutici l'età ($P = 0.031$) - con età più giovani associate ad un rischio maggiore - e il tipo di antifungino prescritto ($P = 0.024$). L'analisi multivariata, elaborata includendo quali covariate i fattori di rischio con $P < 0.2$ all'analisi univariata, ha, infine, identificato il tipo di antifungino in corso quale unico fattore predittivo significativo del rischio di riscontro di livelli sub-terapeutici al TDM ($P = 0.036$).

La figura 5.2 mostra la distribuzione, per ciascun azolo, dei livelli plasmatici misurati nel corso dello studio. Le mediane dei livelli di itraconazolo in capsule (0.39 mg/l, IQR: 0.15 - 0.88 mg/l) e voriconazolo (0.67 mg/l, IQR: 0.22 - 1.36 mg/l) sono risultate inferiori ai valori target raccomandati, rispettivamente pari a 0.5 mg/l e 1 mg/l. Itraconazolo in soluzione orale (0.80 mg/l, IQR: 0.36 - 1.40 mg/l) e posaconazolo (1.05 mg/l, IQR: 0.4 - 1.7 mg/l), invece, hanno

Tabella 5.3. Analisi univariata dei fattori di rischio associati a livelli sub-terapeutici al TDM.

	Livelli sub-terapeutici	Livelli terapeutici	P value
Pazienti, n	49 (53.8%)	42 (46.2%)	-
Età, anni	24.8 ± 6.4	31.6 ± 10.0	0.031
Genere, M/F	23 (46.9%) / 26 (53.1%)	25 (59.5%) / 17 (40.5%)	0.354
BMI, kg/m ²	20.4 ± 3.2	21.9 ± 3.8	0.471
FEV ₁ , % predetto	50.7 ± 20.3	47.4 ± 3.1	0.135
Terapia con IPP, n	34 (69.4%)	22 (52.4%)	0.832
Insufficienza pancreatica, n	45 (91.8%)	38 (90.5%)	0.878
Azolo impiegato ^a	-	-	0.024

BMI: body mass index; FEV₁: volume espiratorio forzato dopo un secondo; IPP: inibitori di pompa protonica.
a. Vedi tabella 5.2 per il dettaglio dei risultati del TDM dei singoli azoli impiegati durante lo studio.

mostrato livelli terapeutici a target (rispettivamente > 0.5 mg/l e 1 mg/l) in oltre il 50% dei casi (figura 5.2 e tabella 5.2). Complessivamente, per voriconazolo ed itraconazolo in capsule è stata riscontrata una probabilità 1.378 volte maggiore di riscontrare livelli plasmatici sub-terapeutici rispetto a itraconazolo in soluzione orale e posaconazolo. Ciononostante, livelli sub-ottimali sono stati riscontrati frequentemente anche in pazienti trattati con itraconazolo liquido (48.4%) e posaconazolo (48.0%) (tabella 5.2).

5.3.3. Sensibilità agli azoli e sviluppo di resistenza nel tempo

È stata valutata l'emergenza di ceppi resistenti agli azoli tra tutti i ceppi positivi per *Aspergillus* spp. e NAFF durante l'intero periodo di osservazione di due anni. All'inizio dello studio, 88 pazienti (96.7%) risultavano già colonizzati da specie fungine patogene. Soltanto due pazienti presentavano colonizzazioni preesistenti da parte di ceppi resistenti agli azoli (*Aspergillus fumigatus* in un caso e *Rasamsonia aspergillacea* nell'altro). La probabilità per un paziente di sviluppare resistenza agli azoli nel corso dello studio è risultata pari al 10.7% (95% CI: 3.8 - 17.1%) a 1 anno e al 21.4% (95% CI: 11.5 - 41.0%) a 2 anni (figura 5.3).

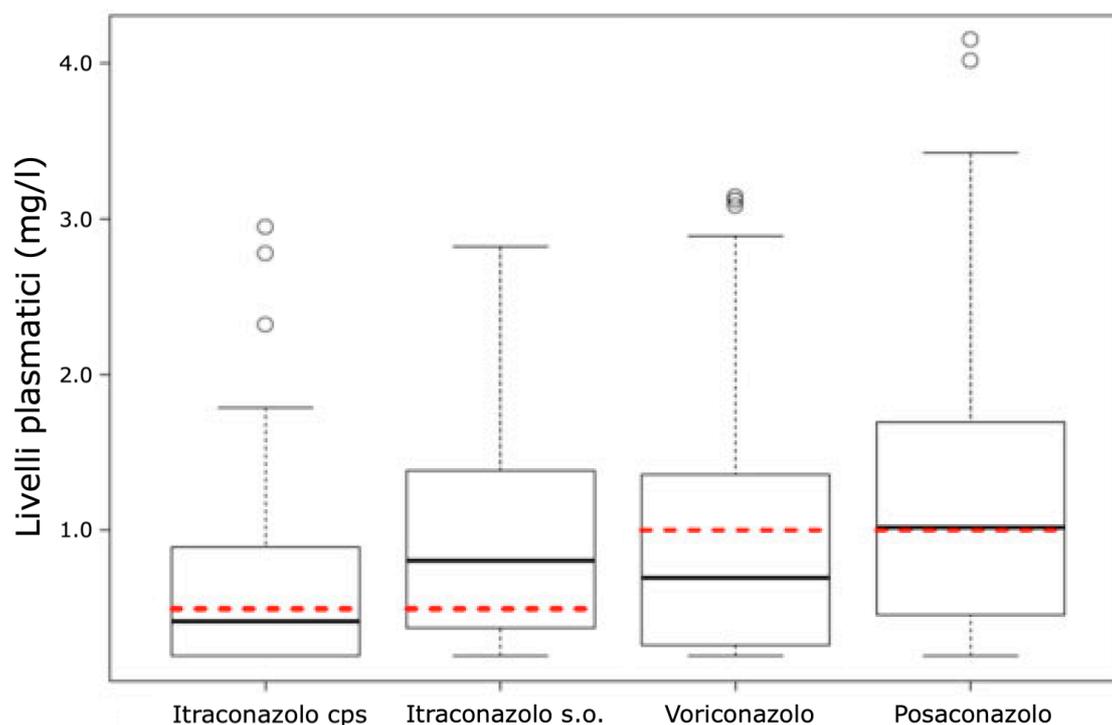


Figura 5.2. Distribuzione dei livelli plasmatici dei singoli triazoli misurati durante il periodo di studio in rapporto al rispettivo target terapeutico minimo raccomandato (linea rossa tratteggiata). I dati relativi ai TDM dell'isavuconazolo non sono mostrati in quanto quest'ultimo è stato utilizzato in un numero ristretto di casi ($n = 3$) e poiché non esistono ancora raccomandazioni definitive sulla concentrazione plasmatica minima da ottenere durante il trattamento.

Una seconda analisi è stata effettuata per investigare in merito al possibile impatto della patologia fungina sottostante sullo sviluppo di resistenza agli azoli. Sebbene l'analisi per sottogruppi sia stata limitata dalla limitata numerosità campionaria, la regressione univariata di Cox ha complessivamente riscontrato una relazione significativa tra i due fattori ($P = 0.003$) (figura 5.4). La significatività è stata guidata dal peso specifico della resistenza agli azoli osservata a 2 anni tra i pazienti trattati per colonizzazione da NAFF e, in minor misura, tra quelli trattati per bronchite da *Aspergillus*, con una percentuale, per ciascun gruppo, di pazienti liberi da resistenza a 2 anni pari, rispettivamente, al 48.2% (95% CI: 38.3 - 100%) e al 67.8% (95% CI: 0.44 - 100%) (figura 5.4 e tabella 5.4).

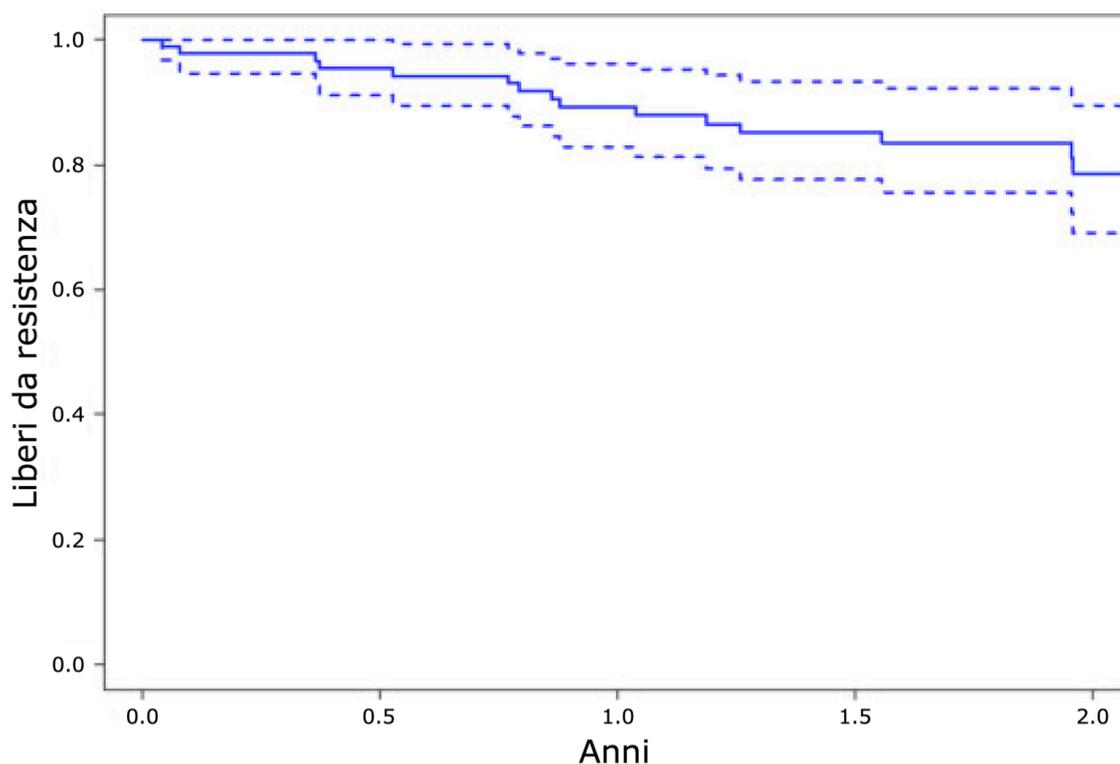


Figura 5.3. Curva di Kaplan-Meier raffigurante la probabilità dei partecipanti di rimanere liberi da resistenza ai triazoli nel corso dell'intera durata dello studio.

Lungo l'intera durata dello studio sono stati raccolti, in totale, 1618 campioni di espettorato, di cui 628 (38.8%) sono risultati positivi per specie fungine: 296 erano positivi esclusivamente per *Candida* spp. (esclusi da ulteriori analisi in quanto non oggetto dello studio) e gli altri 332 per uno o più funghi filamentosi. Tra questi, la sensibilità agli antifungini è stata testata su un totale di 273 campioni: 88 (32.2%) campioni sono risultati positivi per ceppi resistenti agli azoli, rappresentati per il 59.1% da ceppi di ARAf. È stata, altresì, analizzata l'evoluzione annuale della resistenza agli azoli tra le singole specie fungine all'interno della coorte di studio, come evidenziato in tabella 5.5. Tra i campioni positivi per *Aspergillus fumigatus*, la prevalenza di ARAf è passata dal 23.0% del primo anno di osservazione, al 55.6% di fine studio; per *Rasamsonia* spp. la percentuale di ceppi resistenti è triplicata dal 33.3% al 100%.

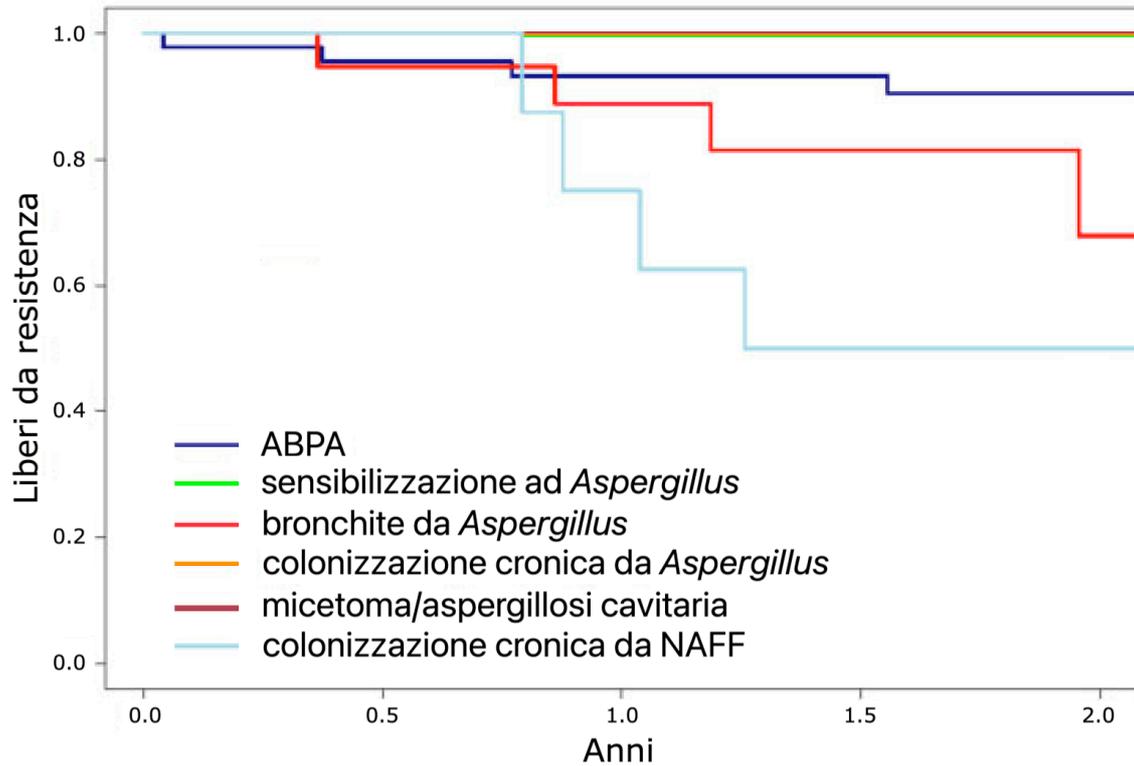


Figura 5.4. Curve di Kaplan-Meier per la probabilità dei partecipanti di rimanere liberi da resistenza ai triazoli, in base alla patologia fungina sottostante.

È stata effettuata un'ulteriore analisi sull'evoluzione dello specifico profilo di resistenza agli azoli da parte di *Aspergillus fumigatus*, in quanto specie numericamente più rappresentativa tra quelle isolate. Come evidenziato dai dati della tabella 5.6, la sensibilità a itraconazolo da parte di *Aspergillus fumigatus* è andata a scendere dal 77% del primo anno al 39.3% del secondo anno. Un trend simile, seppur di entità decisamente più limitata, è stato osservato anche per i profili di suscettibilità verso voriconazolo e posaconazolo. La progressiva acquisizione, a partire da ceppi totisensibili, di resistenza combinata a itraconazolo, voriconazolo e posaconazolo è stata osservata in 3 pazienti colonizzati da *Aspergillus fumigatus* (in un caso con co-colonizzazione da *Scedosporium apiospermum* e *Lomentospora prolificans*): in tutti e tre i casi si è assistito a un progressivo incremento nella frequenza e nella complessità delle riacutizzazioni

polmonari, con associato significativo decadimento della funzionalità polmonare, richiedenti numerosi cicli di terapia antibiotica/antifungina endovenosa.

Tabella 5.4. Dettaglio della probabilità di rimanere liberi da resistenza agli azoli lungo l'intero periodo di osservazione, in base alla patologia fungina sottostante.

Anno	Numero a rischio	Numero di eventi	Sopravvivenza ^a
ABPA			
0	46	0	1 (1 - 1)
1	39	3	0.932 (0.861 - 1)
2	21	1	0.905 (0.82 - 0.999)
Sensibilizzazione da <i>Aspergillus</i>			
0	6	0	1 (1 - 1)
1	5	0	1 (1 - 1)
2	1	0	1 (1 - 1)
Bronchite da <i>Aspergillus</i>			
0	21	0	1 (1 - 1)
1	15	2	0.888 (0.753 - 1)
2	5	2	0.678 (0.442 - 1)
Colonizzazione cronica da <i>Aspergillus</i>			
0	4	0	1 (1 - 1)
1	4	0	1 (1 - 1)
2	2	0	1 (1 - 1)
Micetoma/aspergillosi cavitaria			
0	4	0	1 (1 - 1)
1	4	0	1 (1 - 1)
2	3	0	1 (1 - 1)
Colonizzazione cronica da NAFF			
0	9	0	1 (1 - 1)
1	6	2	0.750 (0.503 - 1)
2	4	2	0.482 (0.383 - 1)

NAFF: funghi filamentosi non-*Aspergillus*.

a. Libertà da resistenza antifungina (95% CI).

In ultimo, è stato valutato il contributo dato dal riscontro di livelli sub-terapeutici al TDM allo

sviluppo di resistenza mediante il modello a quattro stadi precedentemente illustrato. L'analisi non ha identificato alcun fattore, tra le covariate esaminate – incluso il riscontro di livelli plasmatici sub-terapeutici – significativamente associato alla comparsa di resistenza antifungina nel corso dello studio. La matrice delle probabilità di transizione (tabella 5.7) mostra una probabilità del 16% (95% CI: 8.4 – 40.1%) che un ceppo isolato sviluppi una resistenza agli azoli da un precedente stato di sensibilità agli stessi. Il tempo di permanenza rappresenta il tempo medio trascorso in ciascuno stadio. Una volta risultati colonizzati da un isolato fungino sensibile agli azoli, i partecipanti sono rimasti in tale stadio per un intervallo medio di 49 giorni (95% CI: 20 – 102).

Tabella 5.5. Resistenza agli azoli tra le colture sottoposte a test di sensibilità.

Specie fungina	Colture positive ^a	Isolati resistenti agli azoli ^b		
		Totale	I anno	II anno
<i>Aspergillus fumigatus</i>	170 (51.2%)	52/137 (38.0%)	17/74 (23.0%)	35/63 (55.6%)
<i>Aspergillus</i> spp. (non- <i>fumigatus</i>)	2 (0.6%)	1/2 (50.0%)	1/2 (50.0%)	0
<i>Scedosporium apiospermum</i>	88 (26.5%)	6/67 (9.0%)	3/24 (12.5%)	3/43 (7.0%)
<i>Lomentospora prolificans</i>	4 (1.2%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	0
<i>Exophiala dermatitidis</i>	45 (13.6%)	12/46 (26.1%)	8/27 (29.6%)	4/19 (21.1%)
<i>Rasamsonia</i> spp.	22 (6.6%)	12/16 (75.0%)	2/6 (33.3%)	10/10 (100%)
<i>Penicillium</i> spp.	1 (0.3%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	0

a. Dati espressi come n (% del totale dei campioni positivi per funghi filamentosi, N = 332).

b. Dati espressi come n/campioni positivi per la corrispondente specie fungina e sottoposti a test di sensibilità antifungina nell'anno indicato.

5.4. DISCUSSIONE

Il presente studio è il primo a fornire un punto di vista *real-life* sul tema della farmacocinetica e l'evoluzione della farmacoresistenza antifungina nello specifico contesto di un'ampia coorte di pazienti adulti affetti da FC, trattati con triazoli per infezioni croniche delle vie aeree da

parte di funghi filamentosi. I risultati di questo studio sottolineano, in primis, l'ampia variabilità interindividuale nella cinetica degli azoli e l'elevata frequenza di livelli plasmatici sub-terapeutici riscontrata al TDM in tutti gli azoli usati come prima linea di trattamento.

Tabella 5.6. Evoluzione del profilo di sensibilità agli azoli da parte di *Aspergillus fumigatus*.

Farmaco/Sensibilità	Isolati resistenti agli azoli ^a	
	I anno	II anno
Itraconazolo		
sensibile	57 (77.0%)	24 (38.1%)
intermedio	2 (2.7%)	6 (9.5%)
resistente	15 (20.3%)	33 (52.4%)
Voriconazolo		
sensibile	58 (78.4%)	37 (58.7%)
intermedio	16 (21.6%)	24 (38.1%)
resistente	0	2 (3.2%)
Posaconazolo ^b		
sensibile	17 (56.7%)	21 (41.2%)
intermedio	13 (43.3%)	24 (47.0%)
resistente	0	6 (11.8%)
Isavuconazolo ^b		
sensibile	3 (100%)	5 (100%)
resistente	0	0

a. Dati espressi come n (%), rispetto al numero di campioni sui quali è stata testata la sensibilità al farmaco specifico per quel dato anno, ovvero:

- itraconazolo: I anno, N = 74; II anno, N = 63;
- voriconazolo: I anno, N = 74; II anno, N = 63;
- posaconazolo: I anno, N = 30; II anno, N = 51;
- isavuconazolo: I anno, N = 3; II anno, N = 5.

b. La sensibilità verso posaconazolo ed isavuconazolo non è stata testata di routine, ma solo in caso di riscontro di ridotta sensibilità del ceppo isolato verso itraconazolo e/o voriconazolo.

L'analisi univariata dei fattori di rischio associati al riscontro di livelli sub-terapeutici ha mostrato come i pazienti più giovani presentino un rischio maggiore. Sebbene tale associazione non sia stata confermata dall'analisi multivariata, il riscontro più frequente di livelli sub-

terapeutici tra i pazienti più giovani richiede maggiori approfondimenti e studi appropriati. In questo studio retrospettivo non è stato possibile investigare in merito all'aderenza al trattamento da parte dei pazienti; tuttavia, numerosi studi hanno evidenziato in precedenza come la compliance alla terapia medica in FC sia spesso sub-ottimale e come la transizione dall'età adolescenziale a quella adulta sia un importante fattore contribuente.^{145, 146}

Tabella 5.7. Matrice delle probabilità di transizione elaborata con un modello a quattro stadi.

Stadio	Probabilità di transizione allo stadio:		
	1 / 2	3	4
1 / 2	0.806 (0.666 - 0.870)	0.084 (0.045 - 0.139)	0.110 (0.063 - 0.244)
3	0.761 (0.532 - 0.834)	0.079 (0.037 - 0.142)	0.160 (0.084 - 0.409)

Stadio 1: assenza di crescita fungina; stadio 2: positività per specie fungina, analisi di suscettibilità antifungina non effettuata; stadio 3: positività per specie fungina sensibile agli azoli; stadio 4: positività per specie fungina resistente a uno o più azoli.

Al contrario, significativa è risultata l'associazione tra livelli plasmatici non a target e lo specifico tipo di azolo somministrato in terapia. Itraconazolo in capsule e voriconazolo sono risultati caratterizzati da una probabilità significativamente maggiore di riscontrare livelli sub-terapeutici rispetto a itraconazolo in soluzione orale e posaconazolo, con una mediana al TDM inferiore al target minimo raccomandato dalle linee guida.^{20, 119} Questi risultati sono in linea con quanto già noto in merito alla ridotta biodisponibilità orale dell'itraconazolo in capsule e all'estrema variabilità farmacocinetica di itraconazolo e voriconazolo.^{19, 147, 148} Ciò desta particolare preoccupazione riguardo l'appropriata estrapolazione e l'affidamento, per la patologia fungina in FC, alle raccomandazioni terapeutiche delle linee guida internazionali esistenti sulle infezioni fungine invasive, in cui il voriconazolo è considerato come la terapia di prima linea.^{119, 120} Allo stesso modo, questi dati fanno riflettere anche in considerazione di un recente sondaggio che ha coinvolto 94 centri di cura FC del Regno Unito,¹⁸ in cui proprio

l'itraconazolo in capsule è risultato essere l'antifungino di prima scelta nel trattamento di diverse patologie fungine in FC da parte di un'ampia percentuale di operatori intervistati. L'itraconazolo in formulazione liquida è noto per essere caratterizzato da una biodisponibilità orale ben maggiore della formulazione in capsule; tuttavia, la scarsa palatabilità e la modalità di somministrazione, non altrettanto facile nella quotidianità quanto quella delle capsule, ne inficia la compliance.^{19, 121, 149} Al contrario, il posaconazolo in compresse a rilascio prolungato, utilizzato dai partecipanti del nostro studio, ha mostrato un profilo migliore in termini di biodisponibilità e una farmacocinetica più regolare, in accordo con quanto suggerito dalla letteratura in merito all'ottenimento di livelli plasmatici a target, alla posologia comunemente raccomandata, nella maggioranza dei casi di aspergillosi cronica in pazienti non affetti da FC.¹⁵¹ Ciononostante, seppur con risultati significativamente migliori di quanto osservato con itraconazolo in capsule e voriconazolo, una frequenza decisamente non trascurabile di livelli sub-terapeutici è stata registrata anche tra i pazienti in trattamento con posaconazolo.

Nella casistica in esame, soltanto un numero esiguo di pazienti (n = 3) è stato sottoposto a trattamento con isavuconazolo, un antifungino di nuova generazione caratterizzato da un'eccellente biodisponibilità orale, farmacocinetica prevedibile e minori interazioni farmacologiche rispetto agli altri membri della classe dei triazoli.^{19, 151} Tra questi pazienti, i livelli plasmatici sono risultati sempre all'interno di un presumibile, seppur non ancora definito con precisione, range terapeutico (2 - 3 mg/l).¹¹⁹ La presenza di soli tre casi in trattamento con isavuconazolo non ne ha permesso l'integrazione a pieno titolo nelle analisi di confronto con gli altri triazoli; va considerato, tuttavia, che lo stesso rappresenta un agente di seconda linea, solitamente impiegato nei casi di fallimento della terapia di prima scelta con itraconazolo, voriconazolo o posaconazolo. Era, pertanto, facilmente ipotizzabile sin dal principio riscontrare un numero così esiguo di pazienti in terapia con isavuconazolo. Futuri

studi sull'argomento dovranno necessariamente includere un maggior numero di pazienti sottoposti a trattamento con isavuconazolo al fine di poterne definire al meglio le caratteristiche farmacocinetiche nello specifico setting del paziente FC e di poterle mettere a confronto con quelle degli altri azoli attualmente a disposizione.

Diversi studi precedentemente pubblicati hanno riportato la prevalenza di ceppi di ARAf tra i pazienti con FC.^{23, 24, 133 - 139} Il presente studio è, tuttavia, il primo a descrivere la sequenza temporale che porta all'emergenza di specie e ceppi resistenti agli azoli. *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum* (e *Lomentospora prolificans*) ed *Exophiala dermatitidis* sono risultati, in diversi studi, le muffe più comunemente isolate dalle vie aeree dei pazienti FC.^{12, 13} I risultati di questo studio sono in linea con i riscontri della letteratura, rappresentando complessivamente queste specie il 92.5% di tutti i campioni di espettorato positivi per funghi filamentosi e l'84.1% tra gli isolati con resistenza agli azoli (tabella 5.5). Così come già descritto in letteratura, anche in questo studio *Aspergillus fumigatus* è risultato essere il patogeno fungino di più frequente riscontro (51.2%). In un periodo di monitoraggio di 2 anni, il 38% dei ceppi isolati di *Aspergillus fumigatus* è risultato resistente ad almeno un azolo, con un incremento preoccupante dei tassi di resistenza dal 23% del primo anno al 55.6% del secondo anno di osservazione (tabella 5.5). In particolare, è stato registrato un significativo aumento di resistenza verso itraconazolo e di sensibilità soltanto intermedia verso voriconazolo e posaconazolo. L'emergenza di tassi di resistenza antifungina così elevati in un periodo di osservazione relativamente breve evidenzia l'assoluta necessità di ricorrere il più frequentemente possibile ai test di sensibilità antifungina su campioni positivi per funghi filamentosi in popolazioni ad alto rischio, come i pazienti affetti da FC.

Nel presente studio è stato registrato un elevato rischio per pazienti adulti affetti da FC in terapia antifungina di essere colonizzati da specie resistenti agli azoli, pari al 10.7% a 1 anno

e al 21.4% a 2 anni (figura 5.3). Sebbene limitata dalla ridotta numerosità campionaria della popolazione in esame, l'analisi dei dati raccolti ha evidenziato un'associazione significativa di tale rischio con la specifica patologia fungina sottostante. Interessante è il risultato per cui il rischio maggiore è stato registrato tra i pazienti in trattamento per colonizzazione cronica da NAFF (figura 5.4, tabella 5.4). Per quanto noto dalla letteratura scientifica, non vi è ancora una conoscenza dettagliata dei meccanismi di farmaco-resistenza tra le muffe non-*Aspergillus*, la qual cosa si aggiunge alle non chiare implicazioni cliniche di tale fenomeno, in considerazione della non unanime interpretazione della patogenicità di tali specie nella storia naturale della FC.^{7, 9, 108 - 111} I risultati ottenuti evidenziano, ancora una volta, la chiara necessità di monitorizzare sistematicamente lo sviluppo di ceppi resistenti tra gli isolati di NAFF tra i pazienti FC e di definirne, attraverso studi appropriati, i meccanismi molecolari sottostanti e i risvolti clinici. Altro dato interessante è rappresentato dalla maggiore predisposizione allo sviluppo di resistenze da parte di *Aspergillus fumigatus* tra i pazienti trattati con azoli per un quadro di bronchite da *Aspergillus* rispetto ai pazienti affetti da ABPA e altre entità nosologiche *Aspergillus*-relate. Sebbene questo risultato richieda conferma da parte di studi futuri, un presupposto plausibile è rappresentato dall'elevata carica fungina tracheobronchiale descritta nella bronchite da *Aspergillus*, con la tendenza a formare biofilm che determina, da una parte, una ridotta esposizione agli agenti ad azione antifungina e, dall'altra, la creazione di un microambiente ipossico potenzialmente in grado di facilitare lo sviluppo e la propagazione di ceppi resistenti agli azoli.^{152, 153}

Ad oggi, poche sono le informazioni disponibili concernenti la relazione tra esposizione protratta a livelli sub-terapeutici di azoli e lo sviluppo di resistenza antifungina. Contrariamente a quanto osservato in casistiche non FC, il presente studio ha evidenziato un'elevata percentuale di TDM sub-ottimali, nonostante il frequente ricorso ad azoli di nuova

generazione, come il posaconazolo, che si suppone sia caratterizzato da proprietà farmacocinetiche più affidabili. Ciononostante, non è stata osservata alcuna associazione significativa tra la presenza di livelli plasmatici sub-terapeutici ed il successivo isolamento di ARAf. Inoltre, la numerosità campionaria ed il disegno dello studio non hanno permesso l'esecuzione di una sub-analisi più approfondita sull'impatto del tempo di esposizione agli azoli e la comparsa di resistenze. Ulteriori studi prospettici longitudinali su casistiche più ampie, associati a una migliore caratterizzazione genetica dei meccanismi di resistenza, sono indispensabili per rispondere con maggiore certezza a questo quesito, di particolare importanza clinica nella popolazione affetta da FC e non solo.

Il presente studio sottolinea la chiara necessità di eseguire regolarmente il TDM all'interno della popolazione FC affetta da patologie fungine, indipendentemente dal tipo di azolo in terapia. Evidenzia, inoltre, il bisogno di istituire, laddove possibile, un'apposita *stewardship* per la gestione delle infezioni fungine croniche del paziente affetto da FC, in maniera simile a quanto recentemente supportato dalla comunità scientifica internazionale nel contesto delle patologie fungine invasive,^{154, 155} sebbene ad oggi siano disponibili in letteratura soltanto evidenze limitate circa l'utilità e l'impatto benefico della *stewardship* antimicrobica nel setting generico delle infezioni fungine croniche. L'istituzione di un programma di *stewardship* antifungina, d'altronde, dovrà integrarsi con un già complesso sistema di gestione e cura della popolazione adulta affetta da FC, spesso rappresentata da individui giovani, impegnati, nel pieno della propria età lavorativa e frequentemente costretti a viaggi di lunghe distanze per raggiungere i centri di cura di riferimento, geograficamente rarefatti e distribuiti per lo più nelle principali città del Paese. Inoltre, le misure precauzionali mirate a ridurre le probabilità di contagio da SARS-CoV2 in una popolazione particolarmente a rischio di complicanze respiratorie maggiori, rendono ancora più complicata l'integrazione di un ulteriore livello di

monitoraggio clinico-laboratoristico, rappresentato dalla necessità di visite aggiuntive in finestre orarie ristrette per il dosaggio dei livelli plasmatici degli azoli al nadir. Ciononostante, la sempre più diffusa accessibilità ai nuovi farmaci modulatori del CFTR, caratterizzati da significative interazioni farmacologiche,¹⁵⁶ fa sì che sia sempre più prioritaria l'esigenza di monitorizzare in maniera quanto più regolare possibile i pazienti in trattamento con triazoli.

Il presente studio ha diverse, importanti limitazioni. Innanzitutto, si tratta di uno studio retrospettivo longitudinale con una numerosità campionaria relativamente limitata. Tuttavia, la casistica, altamente selezionata, di 91 pazienti adulti affetti da FC in trattamento con azoli osservati per un periodo di 2 anni rappresenta una popolazione di studio difficilmente eguagliabile da altri studi monocentrici. Difatti, lo studio è stato appositamente effettuato in collaborazione con l'Adult Cystic Fibrosis Centre del RBHT, riconosciuto unanimemente come uno dei centri di cura per pazienti adulti affetti da FC più grandi e rinomati in tutta Europa, con una casistica annua media di circa 600 pazienti adulti. Gli elevati livelli organizzativi e gli standard qualitativi del centro in questione hanno bilanciato i limiti intrinseci al disegno retrospettivo del presente studio, rappresentati, nello specifico caso, dalla disomogeneità nella prescrizione della terapia antifungina (criteri, scelta della terapia, posologia e durata), nella richiesta di TDM e nell'esecuzione di test di sensibilità antifungina sui campioni con colture positive per funghi filamentosi. Ciononostante, il disegno retrospettivo ha aiutato a fornire, per la prima volta in letteratura nel contesto della FC, un punto di vista *real-life* nella disamina di un tema, quello del TDM, dalla notevole complessità organizzativa (per tempistiche e risorse necessarie) che frequentemente, nella comune pratica clinica, va a contrapporsi alla linearità teorica delle raccomandazioni internazionali disponibili. L'esperienza descritta in questo studio può, pertanto, rappresentare un primo utile riferimento per il confronto con l'organizzazione e la gestione degli altri centri di cura FC nel

mondo. Inoltre, va sottolineato come l'esecuzione di routine di procedure di coltura standardizzate ad alta sensibilità per l'isolamento di specie fungine renda i dati microbiologici ottenuti di elevata qualità e affidabilità rispetto a molti altri studi retrospettivi. Difatti, il ricorso sistematico a pretrattamento mucolitico, l'utilizzo di multipli terreni di crescita selettivi arricchiti con antibiotici e i prolungati tempi di incubazione previsti soddisfano appieno i criteri riconosciuti dalla recente letteratura scientifica come indispensabili per ottenere risultati microbiologici affidabili nel campo della microbiologia fungina in FC.^{12,13}

Nonostante sia stata dimostrata una significativa variabilità nei livelli plasmatici degli azoli ed un'elevata frequenza di livelli sub-terapeutici tra i pazienti adulti affetti da FC, non è stato possibile analizzare l'impatto dei polimorfismi del citocromo P450 sul metabolismo e, dunque, sulla farmacocinetica degli azoli nella popolazione di studio. Ulteriori studi su casistiche più ampie sono necessari per valutare nel dettaglio questo aspetto, così come il ruolo delle interazioni farmacologiche sulla estrema variabilità farmacocinetica degli azoli, in una popolazione cronicamente esposta a terapie farmacologiche estremamente complesse, per quantità e qualità, come quella affetta da FC.

Un ulteriore limite è rappresentato dal non aver potuto indagare in merito ai risvolti clinici e l'impatto sui principali outcome clinici della farmacoresistenza agli azoli. Nella coorte di studio sono stati identificati 3/91 (3.3%) pazienti colonizzati da ceppi di *ARAF* multi-resistente a itra-, vori- e posaconazolo: in tutti e tre i casi, il progressivo restringimento delle opzioni terapeutiche si è associato ad una maggiore complessità nella gestione terapeutica e ad un'importante instabilità clinica, con accelerazione significativa del decadimento funzionale polmonare. Sono, tuttavia, necessari ulteriori studi longitudinali multicentrici per determinare il significato clinico dello sviluppo di resistenza antifungina e le conseguenze su

fattori quali la virulenza del patogeno, la cronicizzazione del quadro infettivo, le interazioni con il sistema immunitario dell'ospite e l'impatto sui principali outcome clinici.

Infine, il presente studio fa parte di un progetto di ricerca più ampio, e tuttora in corso di svolgimento, che mira alla definizione dei meccanismi molecolari alla base della resistenza farmacologica agli azoli e alla integrazione di dati relativi ai principali outcome clinici impiegati in FC. Ciononostante, i risultati di questo studio sono sufficienti a dimostrare una rapida ascesa e propagazione dei livelli di resistenza agli azoli tra specie fungine comunemente implicate in una serie di patologie croniche dell'uomo, come la FC, che possono finire col costituire in tempi rapidi, in assenza di interventi mirati, una grave minaccia alla salute pubblica su scala globale.

6. CONCLUSIONI

In sintesi, il presente studio, condotto su dati estrapolati retrospettivamente dall'esperienza *real-life* di un'ampia casistica di pazienti adulti affetti da FC, evidenzia una significativa percentuale di casi con ridotti livelli plasmatici di tutti i principali triazoli più comunemente impiegati nel trattamento delle infezioni respiratorie da parte di funghi filamentosi ed una preoccupante insorgenza di resistenza agli azoli tra le specie fungine isolate.

In contrasto con quanto comunemente riscontrato nella pratica clinica delle infezioni fungine in FC e con quanto consigliato dalle linee guida internazionali, è stato dimostrato come gli agenti di prima scelta itraconazolo (in particolare la formulazione in capsule) e voriconazolo siano caratterizzati da un significativo rischio di livelli plasmatici sub-terapeutici e, quindi, inefficacia clinica. Il posaconazolo, spesso impiegato quale terapia di seconda scelta, è risultato caratterizzato da un profilo di farmacocinetica più affidabile, con percentuali di livelli plasmatici a target significativamente maggiori rispetto ad itraconazolo e voriconazolo. I risultati di questo studio confermano, dunque, quanto sia indispensabile, per il successo terapeutico, ricorrere regolarmente al TDM nella popolazione FC adulta in trattamento con triazoli.

La rapida espansione di isolati fungini resistenti agli azoli, sia *Aspergillus* spp. che NAFF, in un periodo di osservazione relativamente breve, sottolinea l'imminente necessità di instaurare specifici programmi di *stewardship* antifungina nella popolazione FC. Ulteriori studi prospettici multicentrici sono necessari per chiarire l'impatto dei livelli cronicamente sub-ottimali dei triazoli sui meccanismi molecolari alla base dello sviluppo di resistenza agli stessi.

Infine, ulteriori studi in materia di farmacoterapia con azoli e resistenza antifungina nella popolazione FC e non, sono fortemente caldeggiati al fine di aumentare la consapevolezza

della comunità scientifica internazionale e degli operatori sanitari in merito a quella che rappresenta un'incombente minaccia alla salute pubblica su scala mondiale.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Elborn JS, Bell SC, Madge SL, et al. Report of the European Respiratory Society/European Cystic Fibrosis Society task force on the care of adults with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2016 Feb;47(2):420-8. doi: 10.1183/13993003.00592-2015.
2. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2019 Annual Data Report.
3. Canadian Cystic Fibrosis Registry. 2019 Annual Data Report.
4. UK Cystic Fibrosis Registry. 2020 Annual Data Report.
5. ECFS Patient Registry 2019. Annual Data Report.
6. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2016 Nov 19;388(10059):2519-2531. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00576-6
7. Singh A, Ralhan A, Schwarz C, et al. Fungal Pathogens in CF Airways: Leave or Treat? *Mycopathologia*. 2018 Feb;183(1):119-137. doi: 10.1007/s11046-017-0184-y.
8. Liu JC, Modha DE, Gaillard EA. What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis? *J Cyst Fibros*. 2013 May;12(3):187-93. doi: 10.1016/j.jcf.2013.02.003.
9. Schwarz C, Hartl D, Eickmeier O, et al. Progress in Definition, Prevention and Treatment of Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia*. 2018 Feb;183(1):21-32. doi: 10.1007/s11046-017-0182-0.
10. Schwarz C, Eschenhagen P, Bouchara J P. Emerging Fungal Threats in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia*. 2021 Oct;186(5):639-653. doi: 10.1007/s11046-021-00574-w.
11. Schwarz C, Vandeputte P, Rougeron A, et al. Developing collaborative works for faster progress on fungal respiratory infections in cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2018 Apr 1;56(suppl_1):42-59. doi: 10.1093/mmy/myx106.
12. Coron N, Pihet M, Fréalle E, et al. Toward the Standardization of Mycological Examination of Sputum Samples in Cystic Fibrosis: Results from a French Multicenter Prospective Study. *Mycopathologia*. 2018 Feb;183(1):101-117. doi: 10.1007/s11046-017-0173-1.
13. Delhaes L, Touati K, Faure-Cognet O, et al. Prevalence, geographic risk factor, and development of a standardized protocol for fungal isolation in cystic fibrosis: Results from the international prospective study "MFIP". *J Cyst Fibros*. 2019 Mar;18(2):212-220. doi: 10.1016/j.jcf.2018.10.001.
14. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015 Mar;70(3):270-7. doi: 10.1136/thoraxjnl-2014-206291.
15. Bercusson A, Jarvis G, Shah A. CF Fungal Disease in the Age of CFTR Modulators. *Mycopathologia*. 2021 Oct;186(5):655-664. doi: 10.1007/s11046-021-00541-5.
16. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Sep;132(3):560-566.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2013.04.007.
17. Felton IC, Simmonds NJ. Aspergillus and cystic fibrosis: old disease - new classifications. *Curr Opin Pulm Med*. 2014 Nov;20(6):632-8. doi: 10.1097/MCP.000000000000106.

18. Boyle M, Moore JE, Whitehouse JL, et al. The diagnosis and management of respiratory tract fungal infection in cystic fibrosis: A UK survey of current practice. *Med Mycol.* 2019 Feb 1;57(2):155-160. doi: 10.1093/mmy/myy014.
19. Rivosecchi RM, Samanta P, Demehin M, et al. Pharmacokinetics of Azole Antifungals in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia.* 2018 Feb;183(1):139-150. doi: 10.1007/s11046-017-0189-6.
20. Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM, et al. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J Antimicrob Chemother.* 2014 May;69(5):1162-76. doi: 10.1093/jac/dkt508.
21. Rivelli Zea SM, Toyotome T. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* as an emerging worldwide pathogen. *Microbiol Immunol.* 2021 Dec 6. doi: 10.1111/1348-0421.12957. Online ahead of print.
22. Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, et al. Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J Fungi (Basel).* 2016 Jul 4;2(3):21. doi: 10.3390/jof2030021.
23. Hamprecht A, Morio F, Bader O, et al. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* in Patients with Cystic Fibrosis: A Matter of Concern? *Mycopathologia.* 2018 Feb;183(1):151-160. doi: 10.1007/s11046-017-0162-4.
24. Abdolrasouli A, Scourfield A, Rhodes J, et al. High prevalence of triazole resistance in clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in a specialist cardiothoracic centre. *Int J Antimicrob Agents.* 2018 Nov;52(5):637-642. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.08.004.
25. Maitra A, Kumar V. Cystic Fibrosis. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* (7th edition). 2005.
26. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009 May 30;373(9678):1891-904. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60327-5.
27. Campagna G, Amato A, Majo F et al. Italian Cystic Fibrosis Registry (ICFR): Report 2017-2018. *Epidemiol Prev.* 2021 May-Jun;45(3 Suppl 1):1-37. doi: 10.19191/EP21.3.S1.050.
28. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science.* 1992 May 8;256(5058):774-9.
29. Drumm ML, Collins FS. Molecular biology of cystic fibrosis. *Mol Genet Med.* 1993;3:33-68.
30. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1066-73.
31. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1073-80.
32. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1059-65.
33. Anderson MP, Berger HA, Rich DP, et al. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell.* 1991 Nov 15;67(4):775-84.
34. Hunt JF, Wang C, Ford RC. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7) structure. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Feb 1;3(2):a009514. doi: 10.1101/cshperspect.a009514.
35. Guggino WB, Banks-Schlegel SP. Macromolecular interactions and ion transport in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Oct 1;170(7):815-20.

36. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*. 1995 Aug 11;269(5225):847-50.
37. Reddy MM, Light MJ, Quinton PM. Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature*. 1999 Nov 18;402(6759):301-4.
38. Quinton PM. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet*. 2008 Aug 2;372(9636):415-7. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61162-9.
39. Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, et al. Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):94-7.
40. CFTR2 - Clinical and Functional Translation of CFTR. Disponibile da: <https://cftr2.org/> (ultimo accesso effettuato in data: 04 gennaio 2022).
41. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med*. 2013 Apr;1(2):158-63. doi: 10.1016/S2213-2600(12)70057-7.
42. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls. *Pharmacol Ther*. 2015 Jan;145:19-34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.06.005.
43. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Mar 1;173(5):475-82.
44. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, et al. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005 Oct 6;353(14):1443-53.
45. Collaco JM, Vanscoy L, Bremer L, et al. Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *JAMA*. 2008 Jan 30;299(4):417-24. doi: 10.1001/jama.299.4.417.
46. Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Jan;74(1):93-115. doi: 10.1007/s00018-016-2391-y.
47. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005 May 12;352(19):1992-2001.
48. Stoltz DA, Meyerholz DK, Welsh MJ. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med*. 2015 Jan 22;372(4):351-62. doi: 10.1056/NEJMra1300109.
49. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(3):317-25.
50. Hoegger MJ, Fischer AJ, McMenimen JD, et al. Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science*. 2014 Aug 15;345(6198):818-22. doi: 10.1126/science.1255825.
51. Keiser NW, Birket SE, Evans IA, et al. Defective innate immunity and hyperinflammation in newborn cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-knockout ferret lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015 Jun;52(6):683-94. doi: 10.1165/rcmb.2014-0250OC.
52. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, et al. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*. 1997 Feb 21;88(4):553-60.
53. Hartl D, Gaggari A, Bruscia E, et al. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros*. 2012 Sep;11(5):363-82. doi: 10.1016/j.jcf.2012.07.003.
54. Karp CL, Flick LM, Park KW, et al. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat Immunol*. 2004 Apr;5(4):388-92.

55. Machen TE. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Aug;291(2):C218-30.
56. O'Sullivan BP, Michelson AD. The inflammatory role of platelets in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Mar 1;173(5):483-90.
57. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, et al. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Apr;151(4):1075-82.
58. Pier GB, Grout M, Zaidi TS, et al. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science*. 1996 Jan 5;271(5245):64-7.
59. Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 28;94(22):12088-93.
60. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 30;103(22):8487-92.
61. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun*. 1994 Feb;62(2):596-605.
62. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(3):317-25.
63. Staudinger BJ, Muller JF, Halldórsson S, et al. Conditions associated with the cystic fibrosis defect promote chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 1;189(7):812-24. doi: 10.1164/rccm.201312-2142OC.
64. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med*. 2012 Apr 5;18(4):509-19. doi: 10.1038/nm.2715.
65. Prince AS. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *N Engl J Med*. 2002 Oct 3;347(14):1110-1.
66. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, et al. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*. 2005 Aug 25;436(7054):1171-5.
67. Chotirmall SH, Smith SG, Gunaratnam C, et al. Effect of estrogen on *Pseudomonas mucoidy* and exacerbations in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2012 May 24;366(21):1978-86. doi: 10.1056/NEJMoa1106126.
68. Hoffman LR, Déziel E, D'Argenio DA, et al. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 26;103(52):19890-5.
69. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2015 Jan;6(1):26-41. doi: 10.1007/s13238-014-0100-x.
70. Regamey N, Jeffery PK, Alton EW, et al. Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax*. 2011 Jul;66(7):624-9. doi: 10.1136/thx.2009.134106.
71. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, et al. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*. 2015 Jul;14(4):419-30. doi: 10.1016/j.jcf.2015.03.003.

72. Farrell PM, White TB, Ren CL, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr*. 2017 Feb;181S:S4-S15.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.09.064.
73. Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Jul;52:94-102. doi: 10.1016/j.biocel.2014.02.023.
74. Quittner AL, Abbott J, Georgiopoulos AM, et al. International Committee on Mental Health in Cystic Fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus statements for screening and treating depression and anxiety. *Thorax*. 2016 Jan;71(1):26-34. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207488.
75. Flume PA, Mogayzel PJ Jr, Robinson KA, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: pulmonary complications: hemoptysis and pneumothorax. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Aug 1;182(3):298-306. doi: 10.1164/rccm.201002-0157CI.
76. Bhatt JM. Treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev*. 2013 Sep 1;22(129):205-16. doi: 10.1183/09059180.00006512.
77. Bilton D, Canny G, Conway S, et al. Pulmonary exacerbation: towards a definition for use in clinical trials. Report from the EuroCareCF Working Group on outcome parameters in clinical trials. *J Cyst Fibros*. 2011 Jun;10 Suppl 2:S79-81. doi: 10.1016/S1569-1993(11)60012-X.
78. Flume PA, Mogayzel PJ Jr, Robinson KA, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: treatment of pulmonary exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Nov 1;180(9):802-8. doi: 10.1164/rccm.200812-1845PP.
79. Brody AS, Tiddens HA, Castile RG, et al. Computed tomography in the evaluation of cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Nov 15;172(10):1246-52.
80. Pillarisetti N, Williamson E, Linnane B, et al. Infection, inflammation, and lung function decline in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jul 1;184(1):75-81. doi: 10.1164/rccm.201011-1892OC.
81. Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2007 Aug;151(2):134-9, 139.e1.
82. Kosorok MR, Zeng L, West SE, et al. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr Pulmonol*. 2001 Oct;32(4):277-87.
83. Saiman L, Siegel JD, LiPuma JJ, et al. Infection prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014 Aug;35 Suppl 1:S1-S67. doi: 10.1086/676882.
84. Schaffer K. Epidemiology of infection and current guidelines for infection prevention in cystic fibrosis patients. *J Hosp Infect*. 2015 Apr;89(4):309-13. doi: 10.1016/j.jhin.2015.02.005.
85. Floto RA, Olivier KN, Saiman L, et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax*. 2016 Jan;71 Suppl 1:i1-22. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207360.
86. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2013 May 4;381(9877):1551-60. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60632-7.
87. Bryant JM, Grogono DM, Rodriguez-Rincon D, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science*. 2016 Nov 11;354(6313):751-757. doi: 10.1126/science.aaf8156.

88. Viviani L, Harrison MJ, Zolin A, et al. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros*. 2016 Sep;15(5):619-23. doi: 10.1016/j.jcf.2016.03.002.
89. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Feb 15;175(4):367-416.
90. Haworth CS, Banks J, Capstick T, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax*. 2017 Nov;72(Suppl 2):ii1-ii64. doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-210927.
91. Middleton PG, Chen SC, Meyer W. Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2013 Nov;19(6):670-5. doi: 10.1097/MCP.0b013e328365ab74
92. Ziesing S, Suerbaum S, Sedlacek L. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. *Med Mycol*. 2016 Nov 1;54(8):781-6. doi: 10.1093/mmy/myw035.
93. Engel TGP, Slabbers L, de Jong C, et al. Prevalence and diversity of filamentous fungi in the airways of cystic fibrosis patients - A Dutch, multicentre study. *J Cyst Fibros*. 2019 Mar;18(2):221-226. doi: 10.1016/j.jcf.2018.11.012.
94. Devoto TB, Alava KSH, Pola SJ, et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus* species and other moulds in respiratory samples from Argentinean patients with cystic fibrosis. *J Mycol Med*. 2020 Apr;30(1):100908. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.100908.
95. Engel TGP, Tehupeiry-Kooreman M, Melchers WJG, et al. Evaluation of a New Culture Protocol for Enhancing Fungal Detection Rates in Respiratory Samples of Cystic Fibrosis Patients. *J Fungi (Basel)*. 2020 Jun 9;6(2):82. doi: 10.3390/jof6020082.
96. Duesberg U, Wosniok J, Naehrlich L, et al. Risk factors for respiratory *Aspergillus fumigatus* in German Cystic Fibrosis patients and impact on lung function. *Sci Rep*. 2020 Nov 4;10(1):18999. doi: 10.1038/s41598-020-75886-w.
97. Warris A, Bercusson A, Armstrong-James D. *Aspergillus* colonization and antifungal immunity in cystic fibrosis patients. *Med Mycol*. 2019 Apr 1;57(Supplement_2):S118-S126. doi: 10.1093/mmy/myy074.
98. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003 Oct 1;37 Suppl 3:S225-64.
99. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013 Aug;43(8):850-73. doi: 10.1111/cea.12141.
100. Brandt C, Roehmel J, Rickerts V, et al. *Aspergillus* Bronchitis in Patients with Cystic Fibrosis. *Mycopathologia*. 2018 Feb;183(1):61-69. doi: 10.1007/s11046-017-0190-0.
101. King J, Brunel SF, Warris A. *Aspergillus* infections in cystic fibrosis. *J Infect*. 2016 Jul 5;72 Suppl:S50-5. doi: 10.1016/j.jinf.2016.04.022.
102. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, et al. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2010 Jan;137(1):171-6. doi: 10.1378/chest.09-1103.

103. Reece E, Segurado R, Jackson A, et al. Co-colonisation with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with poorer health in cystic fibrosis patients: an Irish registry analysis. *BMC Pulm Med*. 2017 Apr 21;17(1):70. doi: 10.1186/s12890-017-0416-4.
104. Fillaux J, Brémont F, Murriss M, et al. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand J Infect Dis*. 2012 Nov;44(11):842-7. doi: 10.3109/00365548.2012.695454.
105. Hong G, Alby K, Ng SCW, et al. The presence of *Aspergillus fumigatus* is associated with worse respiratory quality of life in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2020 Jan;19(1):125-130. doi: 10.1016/j.jcf.2019.08.008.
106. Jennifer J Speirs, Cornelis K van der Ent, Jeffrey M Beekman. Effects of *Aspergillus fumigatus* colonization on lung function in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2012 Nov;18(6):632-8. doi: 10.1097/MCP.0b013e328358d50b.
107. Mouhajir A, Matray O, Giraud S, et al. Long-Term *Rasamsonia argillacea* Complex Species Colonization Revealed by PCR Amplification of Repetitive DNA Sequences in Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol*. 2016 Nov;54(11):2804-2812. doi: 10.1128/JCM.01462-16.
108. de Jong CCM, Slabbers L, Engel TGP, et al. Clinical relevance of *Scedosporium* spp. and *Exophiala dermatitidis* in patients with cystic fibrosis: A nationwide study. *Med Mycol*. 2020 Oct 1;58(7):859-866. doi: 10.1093/mmy/myaa003.
109. Schwarz C, Brandt C, Whitaker P, et al. Invasive Pulmonary Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia*. 2018 Feb;183(1):33-43. doi: 10.1007/s11046-017-0199-4.
110. Chmiel JF, Aksamit TR, Chotirmall SH, et al. Antibiotic management of lung infections in cystic fibrosis. II. Nontuberculous mycobacteria, anaerobic bacteria, and fungi. *Ann Am Thorac Soc*. 2014 Oct;11(8):1298-306. doi: 10.1513/AnnalsATS.201405-203AS.
111. Pihet M, Carrere J, Cimon B, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review. *Med Mycol*. 2009 Jun;47(4):387-97. doi: 10.1080/13693780802609604.
112. Boyle M, Moore JE, Whitehouse JL, et al. Laboratory Diagnosis and Characterization of Fungal Disease in Patients with Cystic Fibrosis (CF): A Survey of Current UK Practice in a Cohort of Clinical Microbiology Laboratories. *Mycopathologia*. 2018 Aug;183(4):723-729. doi: 10.1007/s11046-018-0251-z.
113. Tracy MC, Moss RB. The myriad challenges of respiratory fungal infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2018 Nov;53(S3):S75-S85. doi: 10.1002/ppul.24126.
114. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, et al. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Med Mycol*. 2010 Nov;48 Suppl 1:S88-97. doi: 10.3109/13693786.2010.511287.
115. Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, et al. Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2010 Feb;48(1):166-76.e1. doi: 10.3109/13693780903127506.
116. Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, et al. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol*. 2014 Feb;52(2):179-86. doi: 10.3109/13693786.2013.792438.
117. Reece E, McClean S, Greally P, et al. The prevalence of *Aspergillus fumigatus* in early cystic fibrosis disease is underestimated by culture-based diagnostic methods. *J Microbiol Methods*. 2019 Sep;164:105683. doi: 10.1016/j.mimet.2019.105683.

118. Hong G, Miller HB, Allgood S, et al. Use of Selective Fungal Culture Media Increases Rates of Detection of Fungi in the Respiratory Tract of Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol*. 2017 Apr;55(4):1122-1130. doi: 10.1128/JCM.02182-16.
119. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018 May;24 Suppl 1:e1-e38. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.
120. Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016 Aug 15;63(4):e1-e60. doi: 10.1093/cid/ciw326.
121. Conway SP, Etherington C, Peckham DG, et al. Pharmacokinetics and safety of itraconazole in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2004 May;53(5):841-7. doi: 10.1093/jac/dkh175.
122. Clifton IJ, Whitaker P, Metcalfe R, et al. Pharmacokinetics of oral voriconazole in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Oct;66(10):2438-40. doi: 10.1093/jac/dkr300.
123. Li Y, Theuretzbacher U, Clancy CJ, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of posaconazole. *Clin Pharmacokinet*. 2010 Jun;49(6):379-96. doi: 10.2165/11319340-000000000-00000.
124. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents. Version 10.0. Disponibile da: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204_updatd_links_200924.pdf (ultimo accesso effettuato in data: 17 gennaio 2022).
125. Guinea J. Updated EUCAST Clinical Breakpoints against Aspergillus, Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *J Fungi (Basel)*. 2020 Dec 6;6(4):343. doi: 10.3390/jof6040343.
126. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Jun;41(6):1364-8. doi: 10.1128/AAC.41.6.1364.
127. Sharma C, Hagen F, Moroti R, et al. Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* harbouring G54 mutation: Is it de novo or environmentally acquired? *Glob Antimicrob Resist*. 2015 Jun;3(2):69-74. doi: 10.1016/j.jgar.2015.01.005.
128. Bader O, Tünnermann J, Dudakova A, et al. Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jul;59(7):4356-9. doi: 10.1128/AAC.00100-15.
129. Prigitano A, Esposito MC, Romanò L, et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the Italian environment. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Mar;16:220-224. doi: 10.1016/j.jgar.2018.10.017.
130. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, et al. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clin Infect Dis*. 2016 Feb 1;62(3):362-8. doi: 10.1093/cid/civ885.
131. Valsecchi I, Mellado E, Beau R, et al. Fitness Studies of Azole-Resistant Strains of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec;59(12):7866-9. doi: 10.1128/AAC.01594-15.
132. Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, et al. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat*. 2015 Jul-Aug;21-22:30-40. doi: 10.1016/j.drug.2015.08.001.

133. Amorim A, Guedes-Vaz L, Araujo R. Susceptibility to five antifungals of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from chronically colonised cystic fibrosis patients receiving azole therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Apr;35(4):396-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.007.
134. Fischer J, van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E, et al. Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. isolates from German cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jun;69(6):1533-6. doi: 10.1093/jac/dku009.
135. Burgel PR, Baixench MT, Amsellem M, et al. High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb;56(2):869-74. doi: 10.1128/AAC.05077-11.
136. Morio F, Aubin GG, Danner-Boucher I, et al. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Aug;67(8):1870-3. doi: 10.1093/jac/dks160.
137. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, et al. *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J Clin Microbiol*. 2011 Jun;49(6):2243-51. doi: 10.1128/JCM.00213-11.
138. Prigitano A, Esposto MC, Biffi A, et al. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis in Italy. *J Cyst Fibros*. 2017 Jan;16(1):64-69. doi: 10.1016/j.jcf.2016.06.006.
139. Seufert R, Sedlacek L, Kahl B, et al. Prevalence and characterization of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a prospective multicentre study in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Aug 1;73(8):2047-2053. doi: 10.1093/jac/dky147.
140. Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, et al. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2635-42. doi: 10.1128/AAC.05910-11.
141. Steinmann J, Dittmer S, Houbraken J, et al. In Vitro Activity of Isavuconazole against *Rasamsonia* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Oct 21;60(11):6890-6891. doi: 10.1128/AAC.00742-16.
142. Abdolrasouli A, Bercusson AC, Rhodes JL, et al. Airway persistence by the emerging multi-azole-resistant *Rasamsonia argillacea* complex in cystic fibrosis. *Mycoses*. 2018 Sep;61(9):665-673. doi: 10.1111/myc.12789.
143. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents. Version 8.1. Disponibile da: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_8.1_March_2017.pdf (ultimo accesso effettuato in data: 21 gennaio 2022).
144. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents. Version 9.0. Disponibile da: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_9.0_180212.pdf (ultimo accesso effettuato in data: 21 gennaio 2022).
145. Narayanan S, Mainz JG, Gala S, et al. Adherence to therapies in cystic fibrosis: a targeted literature review. *Expert Rev Respir Med*. 2017 Feb;11(2):129-145. doi: 10.1080/17476348.2017.1280399.
146. Jin J, Sklar GE, Min Sen Oh V, et al. Factors affecting therapeutic compliance: A review from the patient's perspective. *Ther Clin Risk Manag*. 2008 Feb;4(1):269-86. doi: 10.2147/tcrm.s1458.

147. Willems L, van der Geest R, de Beule K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Clin Pharm Ther.* 2001 Jun;26(3):159-69. doi: 10.1046/j.1365-2710.2001.00338.x.
148. Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45(7):649-63. doi: 10.2165/00003088-200645070-00002.
149. Barone JA, Moskovitz BL, Guarnieri J, et al. Enhanced bioavailability of itraconazole in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin solution versus capsules in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jul;42(7):1862-5. doi: 10.1128/AAC.42.7.1862.
150. Dekkers BGJ, Bakker M, van der Elst KCM, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Posaconazole: an Update. *Curr Fungal Infect Rep.* 2016;10:51-61. doi: 10.1007/s12281-016-0255-4.
151. Miceli MH, Kauffman CA. Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole Antifungal Agent. *Clin Infect Dis.* 2015 Nov 15;61(10):1558-65. doi: 10.1093/cid/civ571.
152. Seidler MJ, Salvenmoser S, Müller FMC. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Nov;52(11):4130-6. doi: 10.1128/AAC.00234-08
153. Kowalski CH, Morelli KA, Schultz D, et al. Fungal biofilm architecture produces hypoxic microenvironments that drive antifungal resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Sep 8;117(36):22473-22483. doi: 10.1073/pnas.2003700117.
154. Nwankwo L, Periselneris J, Cheong J, et al. A Prospective Real-World Study of the Impact of an Antifungal Stewardship Program in a Tertiary Respiratory-Medicine Setting. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Sep 24;62(10):e00402-18. doi: 10.1128/AAC.00402-18.
155. Johnson MD, Lewis RE, Dodds Ashley ES, et al. Core Recommendations for Antifungal Stewardship: A Statement of the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *J Infect Dis.* 2020 Aug 5;222(Suppl 3):S175-S198. doi: 10.1093/infdis/jiaa394.
156. Shteinberg M, Taylor-Cousar JL. Impact of CFTR modulator use on outcomes in people with severe cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir Rev.* 2020 Mar 20;29(155):190112. doi: 10.1183/16000617.0112-2019.