



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Salute della Donna e del Bambino*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN :

Medicina dello Sviluppo e Scienze della Programmazione

INDIRIZZO: Ematonecologia, Genetica, Malattie rare e Medicina predittiva

CICLO XXVII

**PREDITTORI DI DANNO POLMONARE IN FIBROSI CISTICA: INDAGINE SU
INFEZIONE E INFIAMMAZIONE**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Supervisore :Ch.mo Prof. Eugenio Baraldi

Dottorando : Francesca Lucca

Ai miei genitori, a Giulio e Luca

Ai pazienti ed ai loro genitori

Sommario

1. RIASSUNTO IN ITALIANO	6
2. SUMMARY IN ENGLISH.....	8
3. LA FIBROSI CISTICA	10
3.1 Definizione.....	10
3.2 Epidemiologia	10
3.3 Patogenesi	10
3.4 Manifestazioni cliniche	14
3.5 Diagnosi	17
3.6 Terapia attuale.....	19
3.7 Prognosi	20
4. L'INFIAMMAZIONE IN FIBROSI CISTICA	22
4.1 Disregolazione dell'inflammation in Fibrosi cistica	22
4.2 L'Ossido Nitrico in Fibrosi cistica.....	25
4.3 I metaboliti dell'arginina in Fibrosi Cistica	26
5. L'INFEZIONE IN FIBROSI CISTICA.....	30
5.1 Pseudomonas aeruginosa	30
6. L'INFIAMMAZIONE INDAGATA ATTRAVERSO I BIOMARKERS: ADMA E METABOLITI CORRELATI.....	33
6.1 Background	33
6.2 Scopo.....	36
6.3 Materiali e metodi	36
6.4 Risultati	42
6.5 Discussione	53
7. L'INFIAMMAZIONE E L'INFEZIONE INDAGATE ATTRAVERSO LA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE: LA SEQUENZA DWI.....	59
7.1 Background	59
7.2 Scopo.....	62
7.3 Materiali e metodi	62
7.4 Risultati	65
7.5 Discussione	69
8. INFEZIONE CRONICA ED EFFETTI SULL' ANTIBIOTICO RESISTENZA.....	71
8.1 Background	71
8.2 Scopo.....	73
8.3 Materiali e metodi	73
8.4 Risultati	76

8.5 Discussione	81
9. CONCLUSIONI.....	84
10. BIBLIOGRAFIA	86

1. RIASSUNTO IN ITALIANO

Presupposti: L'infiammazione e l'infezione sono eventi fondamentali alla base della malattia polmonare in Fibrosi cistica (FC) e ne condizionano la progressione. La ricerca di un marker legato alla progressione della malattia e capace di discriminare la necessità di antibiotico-terapia e la risposta a quest'ultima è fervente.

Scopo: il lavoro di questo dottorato ha mirato ad indagare

-se i livelli plasmatici e nel condensato dell'esalato (EBC) di markers di infiammazione emergenti, finora studiati principalmente nell'asma e nell'infiammazione allergica, come Dimetilarginina asimmetrica (ADMA) e i metaboliti correlati, riflettano l'andamento della malattia in FC, in particolare l'esacerbazione respiratoria e la risposta al trattamento antibiotico;

-se la sequenza della RMN diffusion weighted imaging (DWI), nota per un'associazione con l'infiammazione tissutale, applicata al torace, possa distinguere l'esacerbazione respiratoria dalla malattia stabile, ed evidenziare la risposta al trattamento antibiotico e se la RMN toracica sia influenzata dalla colonizzazione cronica da *P. aeruginosa*;

-se la colonizzazione cronica da *P. aeruginosa* comporti nel tempo un'evoluzione delle resistenze antibiotiche di *P. aeruginosa* nei pazienti FC, in particolare nella popolazione in età evolutiva.

Metodi: sono stati svolti quattro lavori

-uno studio prospettico su pazienti pediatriche, suddivisi in stabili ed esacerbati; sono stati raccolti dati clinici, EBC, e plasma negli stabili all'arruolamento e, negli esacerbati, sia prima che dopo terapia antibiotica. ADMA e i metaboliti correlati sono stati misurati nel plasma e nell'EBC tramite cromatografia Ultra performance abbinata a spettrometria di massa tandem (UPLC-MS/MS) e confrontati con una popolazione di controlli sani;

-uno studio prospettico su pazienti pediatriche stabili, con raccolta di EBC ogni 30 giorni, per 6 mesi o fino ad esordio di esacerbazione; ADMA e i metaboliti correlati sono stati dosati e correlati alla funzionalità respiratoria;

-uno studio prospettico su pazienti suddivisi in stabili ed esacerbati; dati clinici, spirometria e RMN torace sono state eseguite negli esacerbati prima e dopo terapia antibiotica di 2 settimane, e negli stabili all'arruolamento e dopo due settimane;

-uno studio retrospettivo osservazionale di 4 anni basato sull'estrazione di dati clinici e microbiologici relativi alla sensibilità antibiotica di *P. aeruginosa* in una popolazione di pazienti con colonizzazione cronica da *P. aeruginosa*.

Risultati:

-nell'EBC non si è identificato un marker univoco di infiammazione; in considerazione dell'assenza di differenze di ADMA tra i gruppi di pazienti, e rispetto ai controlli sani, e dell'aumento di Citrullina in FC rispetto ai controlli, è stata posta in discussione la disregolazione del metabolismo di ADMA;

-nel plasma diversi metaboliti studiati sono risultati più alti in FC che nei controlli; ADMA è risultato aumentato nei pazienti esacerbati, mostrando una riduzione a un livello non distinguibile dai pazienti stabili in seguito a terapia antibiotica; Arginina è risultata aumentata in tutti i gruppi, ed in particolare dopo antibiotico-terapia;

-la DWI ha permesso di distinguere pazienti stabili da esacerbati prima del trattamento, andando incontro a miglioramento dopo terapia antibiotica; ha mostrato buona correlazione con i parametri clinici e spirometrici; la concordanza intra e inter osservatore sono risultate molto buone; la RMN torace ha mostrato correlazione con la funzionalità respiratoria cronica e con la colonizzazione da *P. aeruginosa*;

-le sensibilità antibiotiche di *P. aeruginosa* hanno subito un'evoluzione nel corso dei 4 anni osservati, con una riduzione marcata in particolare per i fluorochinoloni ed in particolare nella popolazione pediatrica; all'interno della popolazione pediatrica è stato mostrato un peggioramento delle minime concentrazioni inibenti nel gruppo sottoposto a più cicli antibiotici all'anno.

Conclusioni: la FC per la sua variabilità fenotipica, per le differenze inter-paziente e per le molteplici fonti di variabilità all'interno delle vie aeree, risulta di difficile descrizione da parte di un singolo marker. Inoltre le alterazioni dei pathway infiammatori non sono ancora completamente noti e compresi e, alla luce di quanto trovato nell'EBC, meritano ulteriore approfondimento. I dati su plasma evidenziano il ruolo di ADMA e rispecchiano le alterazioni sistemiche in corso di malattia. Un approccio innovativo come la metabolomica potrebbe in futuro chiarire diversi aspetti e consentire una migliore stratificazione dei pazienti. La RMN torace con l'utilizzo della sequenza DWI sembra avere un promettente ruolo nella localizzazione e quantificazione dell'infiammazione e meriterà un approfondimento per l'utilizzo come outcome clinico e di ricerca.

2. SUMMARY IN ENGLISH

Background: Inflammation and infection are cornerstones in Cystic fibrosis (CF) lung disease. The research about a biomarker related to disease progression, tracking respiratory exacerbations and effectiveness of antibiotic therapy, is fervent.

Aim: this PhD work aimed to investigate:

-if plasma and exhaled breath condensate (EBC) levels of Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related metabolites, reportedly related to inflammation in asthma, could associate to disease history, especially respiratory exacerbation onset and effectiveness of treatment;

-if lung MRI sequence diffusion weighted imaging (DWI), known to depict tissue inflammation, could discriminate between stable disease and exacerbation, and highlight treatment effectiveness; and if morphological MRI may be influenced by chronic colonization of the airways by *P. aeruginosa*;

-if chronic colonization of the airways by *P. aeruginosa* may be characterized by an evolution in antibiotic resistance, especially in pediatric CF population;

Methods: 4 studies were elaborated

-a perspective study on pediatric CF patients, divided into stable and exacerbated patients; clinical data, EBC and plasma were collected in stable group at enrollment, and in exacerbated group before and after antibiotic treatment; ADMA and related metabolites were measured in plasma and EBC through Ultra performance liquid chromatography, coupled with tandem mass spectrometry, and compared to healthy controls;

-a perspective study on pediatric CF patients, in which EBC and clinical data were collected every month for 6 months or till exacerbation; ADMA and related metabolites were measured and correlation with clinical data was tested;

-a perspective study on patients divided into stable and exacerbated; spirometry and RMN were performed in exacerbated patients before and after antibiotic treatment and in stable patients at enrollment and after 2 weeks;

-a retrospective study about a 4-year period, based upon extraction of clinical and microbiologic data about antibiotic sensitivity of *P. aeruginosa* in CF patients chronically colonized by *P. aeruginosa*.

Results:

-an univocal marker of inflammation could not be identified in EBC; given the absence of differences in ADMA levels among patient groups and healthy controls, and the increase of

Citrullin levels in CF compared with controls, a dysregulation of ADMA metabolism was suspected;

-various metabolites were higher in plasma of CF patients than in controls; ADMA was increased in exacerbated patients before antibiotic treatment and decreased to levels similar to stable patients after antibiotic treatment; Arginine was increased in all groups, with a further increase after antibiotic treatment;

-DWI tracked respiratory exacerbation and effectiveness of treatment; a good correlation to clinical and spirometric parameters was proved; inter and intra-observer agreement were very good; morphologic MRI showed correlation with spirometry and colonization of the airways by *P. aeruginosa*;

-the prevalence of antibiotic sensitivity of *P. aeruginosa* showed an evolution during the 4-year study period; a decrease in sensitivity especially to fluoroquinolones was proved; sensitivity diminished to a greater extent in pediatric population; increased minimum inhibitory concentrations were found in pediatric patients who underwent more antibiotic courses per year.

Conclusions: CF has great phenotypic variability among patients and many factors may influence airways conditions, so a marker can hardly describe this complexity. Moreover, inflammatory pathways alterations are still not completely understood, and deserve further investigations, given our findings in EBC. Findings on plasma highlighted ADMA role and depicted systemic alterations of the disease. A novel method as metabolomics could enlighten different aspects of the disease in future and help in the stratification of patients. Thoracic MRI with DWI sequence has shown a promising role in inflammation localization and quantification and surely deserves further detailed studies as clinical and research outcome measure.

3. LA FIBROSI CISTICA

3.1 Definizione

La *Fibrosi Cistica (FC)* è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva e coinvolgimento sistemico, che colpisce principalmente l'apparato respiratorio e intestinale. FC è la principale causa di malattia respiratoria cronica nel bambino ed è responsabile della maggior parte delle insufficienze pancreatiche in età pediatrica. Inoltre è origine di multiformi manifestazioni, quali disidratazione con perdita di sali, poliposi nasale, pansinusite, prolasso rettale, pancreatite, colelitiasi, epatopatia cronica, ostruzione intestinale, sterilità maschile, diabete mellito e diabete.¹⁻³

3.2 Epidemiologia

L'incidenza di FC varia nelle diverse etnie. Essa è più diffusa nella popolazione bianca del Nord Europa, del Nord America, dell'Australia e Nuova Zelanda. L'incidenza varia nei diversi studi ma, in genere, si approssima a 1/3.500 nati vivi (1:2000-3000 in Europa e 1:3500 in USA).¹ È invece molto meno frequente nella popolazione afroamericana (1/17000 nati vivi) e nella popolazione asiatica (1/90.000).² In Italia, i dati di screening neonatale riportano un'incidenza compresa tra 1/2.730 e 1/3.170 nati. Da questi dati si può desumere una frequenza di portatori compresa tra 1/26 e 1/30.^{4,5}

3.3 Patogenesi

La Fibrosi Cistica ha un'ereditarietà di tipo autosomico recessivo. Il gene responsabile della malattia, scoperto nel 1989, si trova sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q31.2), si estende per oltre 250.000 basi e contiene 27 esoni. La proteina codificata, chiamata Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), è composta da 1.480 aminoacidi (170 kDa), e la sua funzione principale riguarda il trasporto transmembrana del cloro. Le mutazioni del gene *CFTR* sono molto numerose: a oggi ne sono state individuate più di 2000.⁶ La frequenza relativa delle mutazioni varia in relazione all'area geografica. La più frequente – $\Delta F508$, ovvero la delezione di un residuo fenilalaninico in posizione 508 – si concentra nella popolazione dell'Europa settentrionale, e in Italia rappresenta il 51% delle mutazioni, mentre è meno frequente nell'Europa meridionale e Israele. Si possono identificare 12 mutazioni che insieme rappresentano il 73% degli alleli responsabili di malattia, con differenze di rilievo tra regioni geografiche limitrofe e addirittura all'interno della stessa regione.^{7,8}

Esistono cinque classi di mutazioni, come è mostrato in Figura 1, delle quali le prime tre sono associate a quadri clinici peggiori:

- I. Difettosa sintesi della proteina
- II. Difettosa processazione della proteina
- III. Difettosa regolazione della proteina
- IV. Produzione di proteina con ridotta funzione di trasporto dell'ione Cloro
- V. Produzione di proteina normale, ma in quantità ridotte

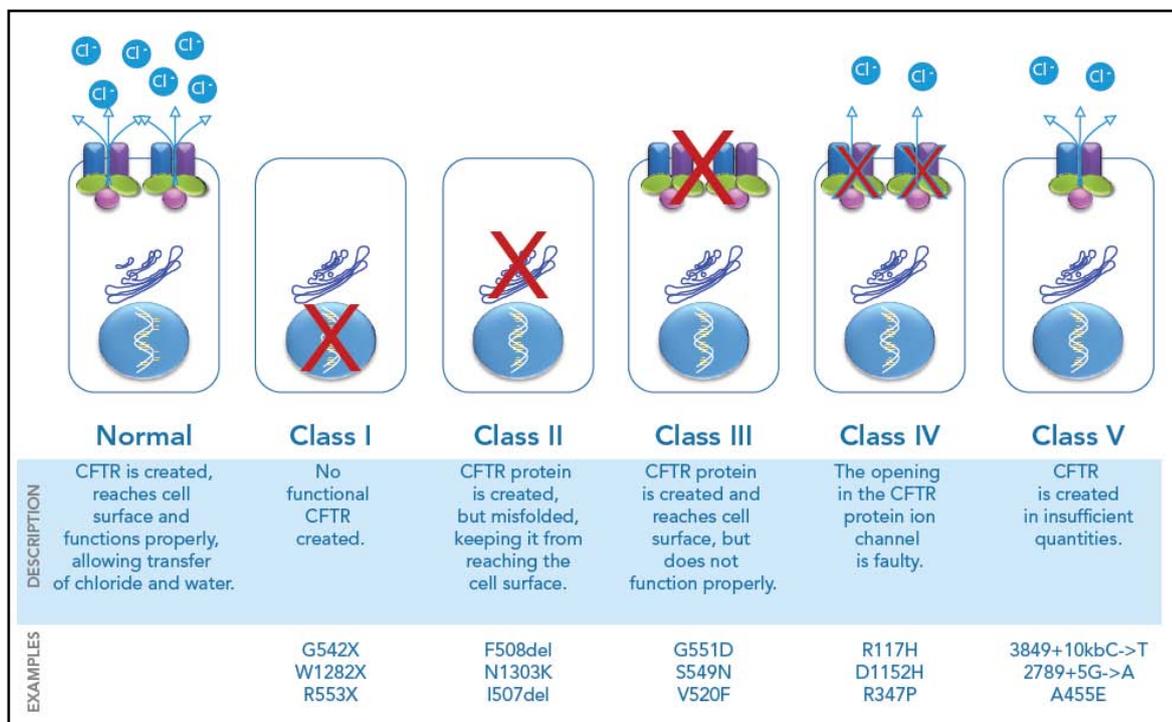


Figura 1. Classi di mutazioni di CFTR. (adattata da http://www.umd.be/CFTR/W_CFTR/gene.html)

Inoltre esistono diversi polimorfismi che, pur non essendo responsabili dell'espressione della malattia, possono modificarne la gravità.⁹

La relazione tra genotipo e fenotipo è un problema complesso, in quanto spesso non consente giudizi prognostici sulla sopravvivenza e sull'insorgenza di disturbi respiratori. Mutazioni classificate come severe ($\Delta F508$) sono associate sempre a insufficienza pancreatica e generalmente a una più rapida progressione nella malattia polmonare. Spesso l'associazione con una mutazione nucleotidica nel gene TGF- $\beta 1$ comporta una malattia più grave, come pure quella con una mutazione nella Mannose binding lectine che conduce a infezioni più severe e sopravvivenza minore. Non tutte le variazioni di sequenza codificante nel gene *CFTR* comportano un quadro clinico identificabile nella malattia: alcune mutazioni sono ritrovate in pazienti con livelli normali di cloro nel sudore, o in pazienti con poche manifestazioni fino all'età adulta, età in cui sviluppano forme atipiche, pancreatite, sinusite, infertilità, o ancora, occasionalmente, in soggetti senza problemi clinici evidenzabili. Per alcuni aspetti della malattia, quale la disfunzione epatica, la

mutazione sul CFTR non ha alcun valore predittivo e molto più importanti risultano mutazioni di altri geni o fattori ambientali.^{1,10}

CFTR è una proteina della famiglia delle ATP Binding Cassette che utilizza ATP cellulare per regolare il flusso del cloro e di altri anioni attraverso la membrana. È costituita da due domini transmembrana ciascuno seguito da un nucleotide – binding domain citosolico, il primo dei quali è seguito anche da un dominio regolatore R, la cui fosforilazione da parte di PKA è necessaria per stimolare l'attività del canale. Il legame del nucleotide al canale porta all'apertura di questo, mentre l'attività ATPasica intrinseca al canale stesso, lo porterebbe alla chiusura. Il cloro viene selezionato ed attratto da un appropriato diametro del canale e dalla presenza di cariche positive all'interno di esso. Assieme al cloro viene trasportato anche l'ione bicarbonato e quindi CFTR gioca un ruolo fondamentale nel trasporto transepiteliale di elettroliti e fluidi.^{11,12}

CFTR é soprattutto espresso nelle cellule epiteliali delle vie aeree, del digerente, delle ghiandole sudoripare, e del genitourinario. Si trova a livelli inferiori anche in cellule non epiteliali, in tessuti non coinvolti dalla malattia, come cornea, endotelio vascolare, dove forse l'espressione di altri geni è in grado di compensare la perdita del CFTR.¹³ Nei dotti sudoripari CFTR guida il riassorbimento di sali, mentre nell'epitelio intestinale, nei dotti pancreatici e nelle vie respiratorie, è promotore della secrezione di ione cloro e bicarbonato.

CFTR agisce inoltre come regolatore di altri processi di trasporto ionico, tra cui il riassorbimento di sodio a mezzo di ENaC (Epithelial Sodium Channel). Infatti l'ATP localmente secreta agisce come stimolatore del CFTR e del CaCC (canale del Cl⁻ attivato dal Ca²⁺), e inibitore dell'ENaC; l'Adenosina attiva il CFTR e, in presenza di quest'ultimo inibisce l'ENaC. Negli epiteli affetti da FC, l'ATP resta l'unico meccanismo di inibizione di ENaC in quanto la regolazione da parte dell'Adenosina è CFTR-mediata, e dunque assente.^{14,15}

Inoltre la coespressione di CFTR ed ENaC impedisce l'attivazione endoproteolitica locale che altrimenti agirebbe clivando i domini extracellulari di ENaC ed aumentandone la probabilità di apertura.¹⁶

La patogenesi nelle vie aeree

È evidente come il bilancio tra i due meccanismi antitetici di secrezione di cloro e riassorbimento di sodio, mantenuto dal CFTR stesso, sia alla base della regolazione del liquido presente nelle vie aeree (ASL: air way surface liquid), e che quindi una riduzione dell'attività di CFTR, conducendo da un lato alla riduzione della secrezione di cloro e dall'altro a un'iperattività di ENaC, porti a uno squilibrio verso il riassorbimento di sodio e quindi verso un concorde eccessivo riassorbimento di

acqua dalle vie aeree risultante in una deplezione di ASL (Figura 2). ASL è composto da uno strato liquido normalmente spesso 7-30 μm che circonda la base delle ciglia (PCL: periciliary liquid) e da uno strato soprastante di muco. Il PCL è un gel polianionico che conferisce all'ambiente periciliare una bassa viscosità tale da consentire un efficace battito delle ciglia, e inoltre impedisce allo strato di muco un contatto diretto con la superficie epiteliale, prevenendone l'adesione e la formazione di tappi (mucus plugs). Lo strato di muco adeguatamente idratato intrappola i patogeni e le particelle inalate nella sua rete di mucine, consentendone la rimozione grazie alla clearance muco ciliare.

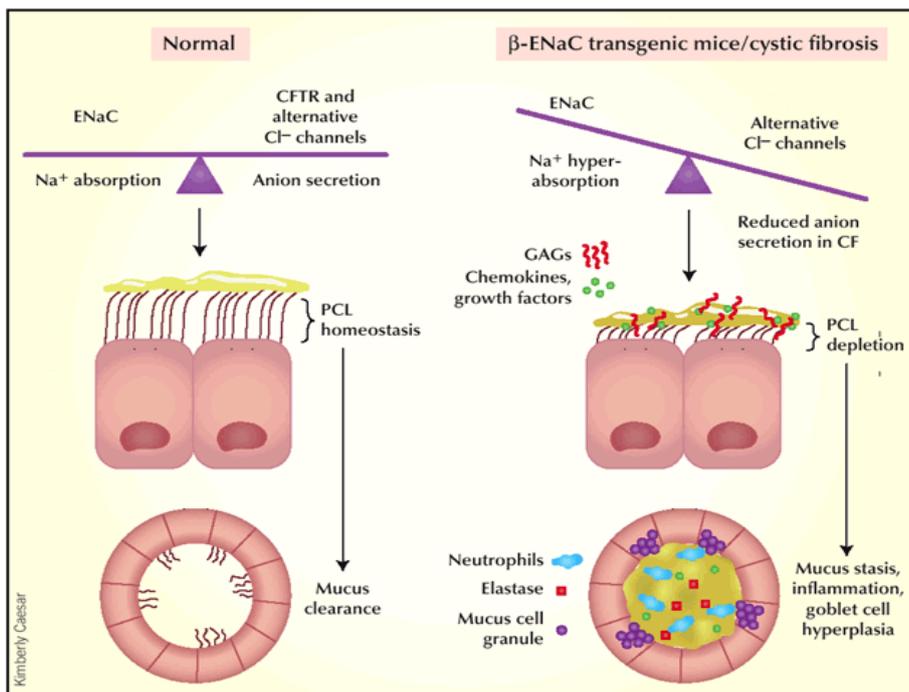


Figura 2. Vie aeree normali e con secrezioni concentrate e viscosi in FC. Tratto da Nature Medicine 10, 452 - 454 (2004)

È evidente come, essendo ENaC e CFTR responsabili dell'idratazione di PCL e dello strato di muco, essi siano anche i determinanti della clearance muco ciliare. È la loro attività reciprocamente regolata a consentire le condizioni ottimali per una clearance efficace. Quando infatti l'attività del CFTR viene persa, si assiste a uno sproporzionato riassorbimento di acqua e sodio che conduce alla deplezione del volume di ASL e alla disidratazione del muco, che non venendo rimosso dalla clearance, si deposita in tappi fortemente adesi alla superficie epiteliale, causando ostruzione, a cominciare dalle piccole vie. I tappi di muco, formando una rete di mucine a maglie strette che limita la diffusione dei batteri e la velocità d'arrivo dei neutrofili e degli altri meccanismi di difesa dell'ospite, forniscono un milieu ideale per la sovra crescita batterica, alla quale contribuiscono anche fungendo da pabulum, conducendo a infezioni respiratorie croniche.^{17,18} Una riduzione del pH intraluminale comporta inoltre maggiore precipitazione della mucina con ostruzione dei dotti e una aumentata captazione di batteri da parte dei tappi stessi di mucina.

Le infezioni saranno poi stimolo all'infiammazione locale che tramite prodotti di derivazione neutrofila, quali radicali ossidativi e proteasi, porta da un lato all'ipersecrezione di muco che va ad alimentare i plugs, dall'altro alla distruzione delle pareti delle vie aeree e del parenchima polmonare peribronchiale, fino alle bronchiectasie e all'insufficienza polmonare che colpiscono i pazienti.

La malattia polmonare non colpisce omogeneamente il polmone. Evidenze patologiche e radiologiche¹⁹ hanno mostrato la predilezione delle bronchiectasie precoci per i lobi superiori. Una spiegazione risiederebbe nel maggiore shear stress presente nei lobi inferiori nella respirazione corrente, che andrebbe quindi a stimolare maggiormente il rilascio di ATP e dunque l'inibizione di ENaC e il mantenimento di maggiori volumi di ASL.¹⁴

La patogenesi negli altri epiteli

É plausibile che eventi patogenetici simili si svolgano anche nei dotti pancreatici e biliari e nei dotti deferenti, conducendo alla disidratazione delle secrezioni proteiche e alla conseguente ostruzione del lume. Nell'epitelio delle ghiandole sudoripare viene invece a mancare il processo di riassorbimento di sali dal sudore isotonico primario; i livelli di cloro e sodio sono quindi elevati. Questo è la causa delle disidratazioni con perdita di sali tipica della patologia e spiega come la diagnosi possa essere fatta con il test del sudore.

3.4 Manifestazioni cliniche

Gli aspetti clinici correlano con l'attività residua di CFTR. I pazienti con meno dell'1% di attività hanno malattia polmonare e insufficienza pancreatica; la funzione pancreatica è risparmiata con il 5% di attività residua; individui con più del 10% di attività presentano assenza bilaterale congenita dei deferenti (CBAVD) o pancreatite cronica idiopatica.¹

Le manifestazioni cliniche della malattia sono caratterizzate dalla presenza di secrezioni esocrine mucose dense che portano, nel caso dell'apparato respiratorio, ad una malattia polmonare cronica ostruttiva con evoluzione verso l'insufficienza respiratoria.

Alcuni tratti della malattia hanno una bassa penetranza (ileo meconio, malattia epatica, diabete), altri hanno una variabile espressività (malattia polmonare), manifestandosi con un ampio spettro di gravità.

Le modalità di comparsa, l'entità dei sintomi e il decorso sono molto variabili. Alcuni malati possono presentare precocemente gli aspetti polmonari della malattia (infezioni respiratorie ricorrenti) e manifestazioni gastrointestinali, quali ileo da meconio alla nascita e sindrome da malassorbimento secondaria a insufficienza pancreatica; altri hanno sintomi respiratori modesti e contenuti fino all'adolescenza (tosse saltuaria, sinusite, poliposi nasale), con un quadro digestivo

normale. Esistono anche forme atipiche di malattia, caratterizzate da sufficienza pancreatica ed espressione clinica respiratoria per lo più modesta; talora la malattia può interessare quasi esclusivamente un unico organo, come nel caso dell'infertilità maschile dovuta a CBAVD oppure, in entrambi i sessi, può manifestarsi con episodi di pancreatite ricorrente.

Nell'ambito di una certa variabilità interindividuale si possono avere altre manifestazioni cliniche di rilievo, tra cui insufficienza pancreatica esocrina, epatopatia, diabete e, nella quasi totalità dei maschi affetti, azoospermia da CBAVD.

Apparato respiratorio. Possono restare asintomatici a lungo o avere intermittenti e prolungate infezioni respiratorie.

I sintomi e i quadri clinici principali possono riguardare le alte e basse vie respiratorie:

-tosse, all'inizio secca, poi produttiva, più importante al risveglio o dopo attività.

-spettorazione purulenta

-wheezing nei primi anni di vita

-emoftoe ed emottisi

-intolleranza all'esercizio fisico

-riniti, sinusiti

-poliposi nasale con rinorrea

Le infezioni causano esacerbazioni dei sintomi respiratori, che possono richiedere l'ospedalizzazione.

L'insufficienza respiratoria, il cor polmonare sono l'evoluzione naturale della malattia.

Il quadro clinico viene anche influenzato dall'infezione e/o colonizzazione delle vie respiratorie da parte di batteri. I microrganismi che influenzano maggiormente il decorso della malattia peggiorandone l'andamento sono i Gram negativi tra cui *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.), *Burkholderia Cepacia*, *Stenotrophomonas Malthophilia*.

Il paziente obiettivamente presenta clubbing e i segni dell'iperinflazione tipici di una malattia bronco ostruttiva: aumento del diametro antero-posteriore del torace (torace a botte), iperfonesi plessica, crepitii. Più tardivamente può comparire cianosi.

La spirometria permette di monitorare la funzione ventilatoria. La prima alterazione che si osserva nei pazienti con FC è l'aumento del rapporto tra il volume residuo e la capacità polmonare totale, suggerendo che la prima alterazione funzionale sia a livello delle piccole vie aeree. Quando il processo patologico progredisce si osservano alterazioni reversibili e irreversibili a carico di FVC (capacità vitale forzata) e FEV₁ (volume espiratorio forzato nel primo secondo); la componente reversibile riflette l'accumulo di secrezioni, mentre quella irreversibile la distruzione cronica della parete delle vie aeree. L'alterazione più precoce alla radiografia standard del torace è l'iper-

insufflazione, che riflette l'ostruzione delle piccole vie aeree. In fase più avanzata si osservano segni di accumulo luminale di muco, inspessimento delle parete bronchiali e bronchiectasie.

Apparato gastrointestinale

Nell'intestino la disfunzione di CFTR comporta una disidratazione del lume intestinale con possibili manifestazioni occlusive sia a carico del tenue che del crasso:

-Ileo meconio nel 20% dei neonati; si presenta con distensione addominale e mancata espulsione di meconio nelle prime 24-48 ore di vita. Il 90% degli ili da meconio hanno come causa la fibrosi cistica.

-Ostruzioni ileali in bambini e giovani adulti, si presenta con crampi e distensione ileale. Spesso obiettivamente si può rilevare una massa palpabile al quadrante addominale inferiore destro.

-Maldigestione causata da insufficienza pancreatica cronica; si presenta con feci abbondanti, untuose, ritardo di maturazione e perdita di peso (quasi il 40% dei pazienti ha peso inferiore al 10°percentile).

-Malnutrizione: anasarca da ipoprotidemia, disfunzioni neurologiche da deficit di vitamina E, ipotrombinemia da deficit vitamina K.

Fegato e vie biliari. A livello della colecisti e vie biliari l'alterata secrezione di sali e acqua può condurre a colecistiti e colelitiasi. La disfunzione epatica si ritrova nel 30% dei pazienti, ma la cirrosi biliare con insufficienza epatica è sintomatica solo nel 2-3% con ittero, ascite, ematemesi da varici, ipersplenismo. Sono possibili la steatosi e la colica biliare da colelitiasi.

Pancreas

Il deficit secretorio di sodio e bicarbonato si associa a quello di acqua. In ultima analisi questo processo porta alla ritenzione degli enzimi e alla conseguente progressiva autodigestione del tessuto pancreatico:

-insufficienza pancreatica esocrina: la ritenzione degli enzimi pancreatici causa malassorbimento, steatorrea, e espone al rischio di sviluppare episodi di pancreatite;

-insufficienza pancreatica endocrina con diabete insulino-dipendente e conseguenti iperglicemia, glicosuria, poliuria e perdita di peso nell'8% dei pazienti tra 11 e 17 anni e nel 18% di quelli tra i 18 e 24; la chetoacidosi è rara ma le complicanze vascolari possono presentarsi dopo 10 anni dall'inizio del diabete; il maggior rischio infettivo può portare a deterioramento clinico.²⁰

Apparato riproduttivo

-Pubertà ritardata: comune sia nel maschio che nella femmina con FC.

-Azoospermia nel 95% dei maschi per mancato sviluppo delle strutture derivanti dai dotti di Wolff, ma la funzione sessuale è in genere preservata.

-Maggior incidenza di ernia inguinale, idrocele, criptorchidismo.

-Amenorrea secondaria, cervicite e accumulo di muco cervicale denso nelle femmine con conseguente riduzione della fertilità.

-La gravidanza può accelerare la progressione polmonare nelle pazienti con funzione respiratoria già moderatamente compromessa.

Ghiandole sudoripare. L'eccessiva perdita di sali può predisporre i bambini a squilibri elettrolitici, specialmente durante episodi di gastroenterite o in presenza di temperature elevate, e provocare disidratazioni anche gravi con alcalosi ipocloremica.¹

Apparato urinario. Una caratteristica clinica di questi pazienti è l'incontinenza urinaria determinata dalla continua pressione sul pavimento pelvico dovuta alla tosse cronica e all'esecuzione della fisioterapia respiratoria. Tale quadro è più frequente nel sesso femminile già dall'età pediatrica per la brevità del uretra, ma con l'aumento della sopravvivenza è una manifestazione presente anche negli adulti di sesso maschile. L'incidenza in uno studio è risultata del 4.8% nei maschi adulti e del 37.9% nelle femmine adulte.^{21,22}

Il rene non è un organo coinvolto dalla malattia di base ma le numerose terapie antibiotiche con aminoglicosidi stanno portando nei soggetti adulti a insufficienza renale cronica. La patologia renale è molto frequente nei trapiantati di polmone che necessitano di terapia immunosoppressiva cronica che molto spesso è nefrotossica.

Apparato osteo-articolare. La maggiore sopravvivenza di questi pazienti sta facendo emergere patologie rilevanti, in particolare il quadro di osteopenia e osteoporosi è diventato molto frequente, La patogenesi è dovuta ad un ridotto assorbimento di calcio e vitamina D a livello intestinale, alle numerose terapie cortisoniche a cui sono sottoposti questi pazienti, alla ritardata pubertà e alla ridotta attività fisica dovuta alla situazione clinica di base. È un quadro che si verifica soprattutto nell'adulto, con una prevalenza di uno Z-score <-1 nel 38% dei pazienti.²³

3.5 Diagnosi

La diagnosi di FC si basa su combinazione di manifestazioni cliniche con il rilievo di CFTR anomala ad uno dei tre test diagnostici validati. Questi comprendono il test del sudore (con cloro e sodio superiori ai limiti di norma), l'analisi genetica che si considera positiva quando identifica due mutazioni che causano la malattia, lo studio della differenza di potenziale elettrico transepiteliale nelle mucose respiratorie o intestinali.

-Test del sudore: è il gold standard per la conferma della diagnosi ed è ritenuto positivo quando il colore è maggiore a 60 mmol/l. È età-specifico in quanto la concentrazione del cloro aumenta con l'età. Va effettuato dopo le prime 24 ore di vita, è un test molto specifico.

-NPD (nasal potential difference) è un test che può essere usato per sostenere o escludere la diagnosi di FC in pazienti con test al sudore dubbio (Cl tra 40-60 mmol/l).

A determinare tale differenza contribuiscono gli elettroliti (soprattutto cloro e sodio) che si trovano nel liquido che riveste la superficie dell'epitelio ma anche nel tessuto sottostante. In condizioni normali questa differenza di potenziale si aggira sui -20mV, mentre nella fibrosi cistica, essendo cloro e sodio carenti a tale livello a causa della mancata attività del canale CFTR, tale tensione si aggira sui -40 millivolt (quindi tensione più alta, in senso negativo, rispetto al normale). In vivo però è praticamente impossibile misurare la tensione transepiteliale. Tuttavia, poiché tutti i tessuti hanno praticamente lo stesso livello di potenziale elettrico, è possibile misurare la differenza di potenziale che esiste tra la mucosa nasale ed un tessuto qualsiasi, che è assimilabile a quella che c'è tra la mucosa nasale e il tessuto sottomucoso. In pratica, il sistema di misura consiste di un elettrodo esploratore (un tubicino contenente liquido con terminale metallico), che viene posizionato sulla mucosa nasale, e di un elettrodo di riferimento consistente in un ago che viene inserito sotto la cute di un braccio. Questo test risulta inoltre preziosissimo per valutare l'effetto di farmaci potenziatori o correttori di CFTR mutato. Lo spostamento dei valori di potenziale dai circa -40mV di partenza a quelli vicini ai valori normali testimonierebbero l'effetto curativo del farmaco a livello del difetto di base della malattia.²⁴

L'1-2% dei pazienti con manifestazioni cliniche compatibili per FC presenta nel sudore valori di cloro normali; nella maggior parte di questi pazienti la PD nasale è aumentata e si colloca nell'ambito di valori diagnostici per FC.

-Analisi genetica: sono necessarie due mutazioni di *CFTR* nel contesto clinico e familiare appropriato per confermare la diagnosi. Il ritrovamento di una sola o di nessuna mutazione non esclude la diagnosi. È importante svolgere il test con un pannello che copra la maggior parte delle mutazioni più frequenti nella popolazione a cui appartiene il paziente. Un pannello con 30 delle più frequenti mutazioni copre l'80-90% dei genotipi. Solo in rari casi si utilizzano pannelli più estesi o il sequenziamento genico.

Test complementari per accertare la diagnosi o stabilire il grado di gravità.

-funzione pancreatica: grasso fecale nelle 72 ore, chimo tripsina fecale, elastasi fecale, lipasi immunoreattiva fecale, pancreas-associated-protein ematica, chemotripsina e esterasi urinarie, pH, bicarbonati, attività di enzimi pancreatici nel succo duodenale

-funzione polmonare: spirometria, radiografia o TAC torace, colture batteriche delle vie respiratorie, radiografia o TAC dei seni paranasali

-fertilità: ecografia e spermogramma.

Screening neonatale. La maggior parte dei neonati con FC possono essere identificati utilizzando la determinazione del tripsinogeno immunoreattivo (IRT) e/o dell'elastasi fecale combinata all'analisi genetica di un numero limitato di mutazioni. Tutti i neonati vengono sottoposti ad un test eseguito attraverso il prelievo di una goccia di sangue. Se l'IRT ha un valore oltre la soglia di normalità, si pone il sospetto di malattia e sulla stessa goccia di sangue essiccato si attua il test genetico: questo è conclusivo per la diagnosi se si individuano due mutazioni *CFTR*. La conferma definitiva o l'esclusione della diagnosi viene comunque affidata al test del sudore, con richiamo del neonato a 20-30 giorni di vita. Questo screening raggiunge una sensibilità del 90%. E' una metodica ormai diffusa in quasi tutte le regioni d'Italia. Lo screening consente la presa in carico da parte di centri specializzati più precocemente che con la diagnosi standard fatta per sintomi; i genitori vengono allertati sul rischio riproduttivo e possono essere indirizzati a un counseling.

Screening del portatore. Lo screening al portatore è stato storicamente riservato nel caso di anamnesi familiare positiva per CF, o nel caso di partners di soggetti affetti da CF. In alcune regioni è stato proposto uno screening di popolazione, il cui vantaggio principale è la possibilità di scegliere di evitare una gravidanza o limitare lo stress causato dall'attesa dei risultati dello screening neonatale.²⁵

3.6 Terapia attuale

Capisaldi del trattamento dopo la diagnosi sono l'educazione del paziente e della famiglia, una definizione corretta del caso e un follow-up intensivo con controlli ogni 2-3 mesi. L'approccio è multidisciplinare e finalizzato a promuovere la clearance delle secrezioni, gestire le infezioni polmonari, fornire un'alimentazione adeguata e prevenire l'ostruzione intestinale, per mantenere una condizione stabile per periodi prolungati.

Il carico terapeutico varia con l'età del paziente, con il grado di coinvolgimento polmonare e multi sistemico.

Nello specifico dell'ambito polmonare, è fondamentale il controllo delle infezioni tramite l'analisi colturale dell'escreato bronchiale e/o dell'aspirato faringeo, il monitoraggio della funzionalità respiratoria e le vaccinazioni, soprattutto verso i patogeni che coinvolgono l'apparato respiratorio. E' imprescindibile anche una corretta sterilizzazione/disinfezione e pulizia del materiale per la terapia inalatoria, in modo da scongiurare l'esposizione a gram-negativi resistenti. Il trattamento a volte può includere una terapia inalatoria e fisioterapica intensiva, una terapia antibiotica orale e/o endovenosa e l'ospedalizzazione nel tentativo di riportare il paziente al suo stato funzionale. È importante ricordare che il regime terapeutico intensivo spesso origina alterazioni iatrogene come iperglicemia e alterazioni della crescita (corticosteroidi), sanguinamenti gastrointestinali (ibuprofene), disfunzioni renali (aminoglicosidi, FANS).

Il trattamento si avvale di terapie non farmacologiche, quali la fisioterapia respiratoria, e farmacologiche quali antibiotici inalatori o sistemici, antinfiammatori steroidei inalatori e sistemici, e non steroidei sistemici, broncodilatatori inalatori a breve e lunga durata d'azione, e mucolitici.

Il trapianto polmonare è l'ultimo step terapeutico e risulta vantaggioso quando la sopravvivenza stimata a 5 anni senza trapianto risulti inferiore al 30%. Indicazioni al trapianto sono: valore di $FEV_1 < 30\%$ del predetto, rapido declino del FEV_1 soprattutto in pazienti giovani presentanti le complicanze più gravi a livello polmonare quali emottisi, pneumotorace refrattario o ricorrente e aumento severo della frequenza delle esacerbazioni.

Nuove prospettive terapeutiche includono agenti farmacologici che promuovono la funzione di CFTR mutato agendo come "protein repair therapy". FDA ha approvato nel 2012 *ivacaftor* per persone di età maggiore dei 6 anni con la mutazione G551D e nel 2015 un'associazione composta da *lumacaftor+ivacaftor* per pazienti omozigoti per delF508. Si tratta di agenti che, nel caso di *ivacaftor* agiscono potenziando l'attività di CFTR, nel caso di *lumacaftor* favorendo la maturazione di CFTR e consentendone la localizzazione sulle membrane cellulari. L'utilizzo di *ivacaftor* nelle mutazioni gating come G551D ha dimostrato prolungato beneficio in termini di test del sudore, FEV_1 , BMI e frequenza di esacerbazioni. Meno certi sono stati i benefici nelle popolazioni omozigoti per delF508 in seguito al trattamento con l'associazione *ivacaftor-lumacaftor*.²⁶ La terapia genica e con cellule staminali sono ancora studiate in fase preclinica per valutarne le potenzialità terapeutiche.

Nell'ambito delle manifestazioni non polmonari il trattamento si compone di:

- trattamento sostitutivo dell'insufficienza pancreatica esorina con estratto pancreatico; si utilizzano microsfere acido resistenti che si dissolvono nell'ambiente alcalino intestinale;
- supplementazione con vitamine liposolubili (A, D, E, K);
- acido ursodesossicolico per favorire il deflusso biliare;
- soluzioni elettrolitiche, in caso di disidratazione;
- lassativi osmotici per favorire il transito intestinale;
- terapia insulinica sostitutiva in pazienti con diabete associato ad FC.^{1,2}

3.7 Prognosi

La sopravvivenza è legata alla natura e alla progressione della malattia polmonare ed è stata collegata a numerosi fattori di rischio, tra cui il genotipo (mutazioni di classi I-III).

Inoltre altre complicanze come il diabete, anch'esse più frequenti nei portatori di mutazioni di classe I-III possono aumentare la mortalità.²⁷

La sopravvivenza è migliorata negli ultimi decenni. Gli ultimi dati della CF Foundation americana descrivono una mediana di sopravvivenza intorno ai 40 anni (Figura 3 e 4). A questo dato hanno

concorso le nuove terapie farmacologiche, il miglioramento delle tecniche di fisioterapia respiratoria, il ricorso al trapianto polmonare e/o epatico, l'aumento delle diagnosi di forme di malattia meno severe e a prognosi buona, misconosciute fino a qualche anno fa.

Fattori prognostici favorevoli sono il sesso maschile, e la provenienza da una famiglia socio economicamente avanzata.²⁸

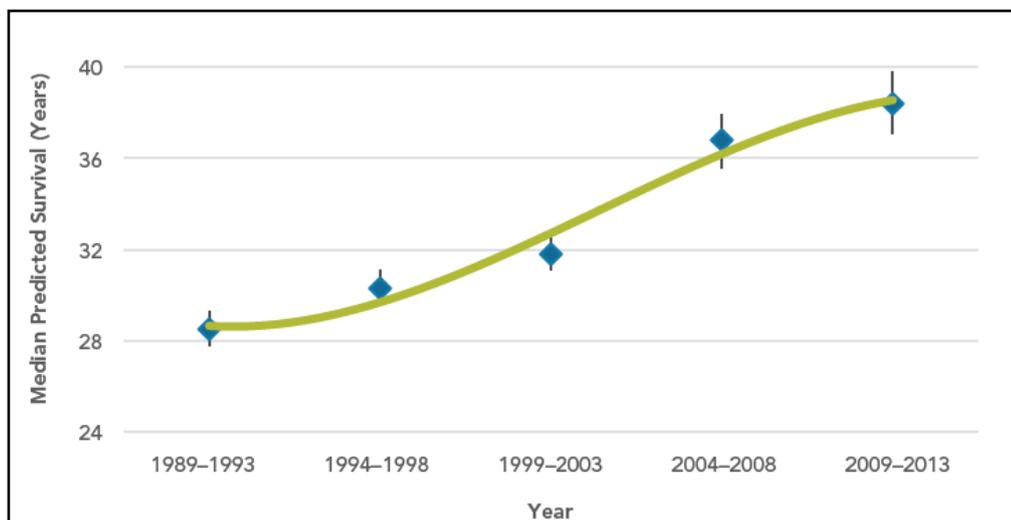


Figura 3: mediana di sopravviveza dei pazienti con FC per coorti di 5 anni. (Cystic Fibrosis Fondation - Patient Registry -Annual data report 2013)

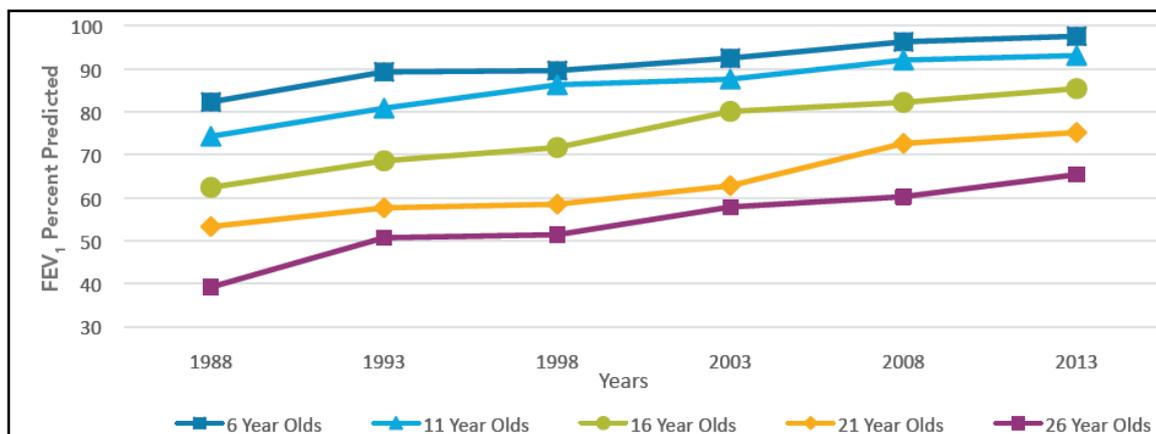


Figura 4: Valore di FEV₁ percentuale del predetto per età. (Cystic Fibrosis Fondation - Patient Registry -Annual data report 2013)

4. L'INFIAMMAZIONE IN FIBROSI CISTICA

4.1 Disregolazione dell'infiammazione in Fibrosi cistica

Infiammazione ed infezione sono elementi caratteristici della malattia polmonare da FC, strettamente legati alla disfunzione di CFTR. La disidratazione di ASL e la compromessa clearance muco ciliare, risultanti da un'insufficiente secrezione di cloro, e da un eccessivo assorbimento di sodio alla superficie apicale delle vie aeree, inducono infezioni recidivanti, che scatenano l'infiammazione neutrofila in un circolo vizioso che conduce al danno delle vie aeree.

La risposta infiammatoria in FC tende ad essere esagerata ma inefficace, ed origina stress ossidativo, fallendo nell'eliminazione dell'infezione dei patogeni, che nella maggior parte dei pazienti diventa cronica e non eradicabile.²⁹

Molto probabilmente CFTR mutato si associa ad un'alterazione di alcune vie di trasduzione del segnale a livello cellulare, quale ad esempio quella di NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Nel polmone, NFκB è richiesto per la trascrizione di numerose molecole pro-infiammatorie, incluse citochine quali interleuchina (IL)1β, TNF-α, IL6. In FC NFκB appare essere persistentemente attivato se non over espresso. Gli attivatori stessi di NFκB come le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono persistentemente presenti; inoltre la stessa stimolazione da parte dei batteri sulla superficie cellulare induce l'attivazione di NFκB. Oltre alla sua attivazione va ricordata una deficitaria inibizione di questo fattore trascrizionale da parte ad esempio di IL10 che, come precedentemente descritto, è poco espressa in questi pazienti.^{30,31}

È inoltre ridotto il PPAR (peroxisome proliferation activated Receptor), un fattore trascrizionale, il quale presenta un'azione opposta rispetto ad NFκB e dunque un'attività contrastante l'infiammazione.³²

In questa malattia è compromessa anche l'attività di INFγ, per l'inibizione del suo pathway a livello di STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1), da parte di PIAS1 (Protein inhibitor of activated STAT-1), overespresso in FC; in ultima analisi questo riduce l'attività di INFγ, in particolare quella antivirale, e ciò può rendere conto della aumentata risposta sintomatologica ad insulti virali in questi pazienti.

La ridotta attività di STAT1 è responsabile della down-regolazione dell'ossido nitrico sintetasi di tipo inducibile (iNOS), con riduzione dei valori dell'ossido nitrico NO, il quale ha una precoce attività battericida, danneggiando così le difese dell'ospite verso le infezioni.³³

Inoltre anche la via di SMAD3 (Small mother against decapentaplegic homolog 3) un intermediario della risposta attivata da TGFβ, che partecipa alla risoluzione del processo infiammatorio, è alterata e dunque contribuisce alla persistenza della diatesi infiammatoria.³⁴

Dunque, uno squilibrio nei segnali infiammatori esiste in FC ³⁵, con ridotte concentrazioni di molecole antinfiammatorie come IL-10, inibitore della risposta macrofagica, e come le lipossine, inibitori della chemiotassi e dell'attivazione neutrofila ^{30,31} e più alti livelli di proteine proinfiammatorie quali la calprotectina, sia nell'escreato che nel siero. ^{36,37}

L'infiammazione delle vie aeree in FC è caratterizzata da un influxo neutrofilo ai polmoni, scatenato da fattori intrinseci ed estrinseci. Tra i fattori intrinseci sicuramente va considerata la funzione di CFTR.

CFTR sembra avere un ruolo nella disregolazione dell'infiammazione. ³⁸ Le cellule epiteliali delle vie aeree in assenza dell'espressione di CFTR mostrano anomalie del segnale e dei processi intracellulari che conducono alla trascrizione di mediatori pro infiammatori. L'accumulo di CFTR alterato nel reticolo endoplasmatico, come avviene nelle mutazioni di classe II, è un fattore di stress che produce una risposta adattativa ed aumenta il signaling infiammatorio tramite l'attivazione endogena di NF- κ B, causando uno squilibrio della risposta pro infiammatoria nelle cellule epiteliali ed immunitarie. ³⁷

La disregolazione nel segnale NF κ B e nella traslocazione nucleare di NF- κ B sono causati inoltre dall'accumulo di ceramide che si verifica in modo età dipendente nelle vescicole lisosomiali delle cellule epiteliali in FC. Inoltre la ceramide è coinvolta nelle vie di TNF α , agisce come fattore proapoptotico con conseguente deposizione di DNA nelle vie aeree che incrementa l'adesione di P. A. ed induce IL-1 conducendo all'infiammazione cronica. ^{39,40}

Le evidenze recenti sono a favore della presenza di infiammazione nei lattanti affetti fin dai primi mesi di vita e l'infiammazione neutrofila è stata evidenziata anche in assenza di infezione ed è associata ad un maggiore declino della funzione polmonare. ^{29,41-44} Studi su modelli murini di FC hanno suggerito una predisposizione allo stato infiammatorio precedente ad ogni insulto infettivo. ⁴⁵ Alte concentrazioni di markers proinfiammatori quali IL-8, IL-6 e IL-1 β , perossidasi ed ossidanti sono state riscontrate nel fluido di lavaggio bronco alveolare (BAL) anche in lattanti FC con normale funzione respiratoria ed in assenza di patogeni. ^{46,47,18}

Bambini più grandi affetti da FC presentano numerosi marcatori di infiammazione elevati a livello polmonare. Oltre alle Interleuchine, ad esempio IL6 e IL8, sono elevati anche i derivati dell'Acido Arachidonico, quali in particolare i Leucotrieni B4 (LTB4), responsabili di broncocostrizione, chemiotassi leucocitaria ed aumentata permeabilità vasale tipica di ogni processo flogistico. Tali mediatori risultano inoltre più elevati in corso di riesacerbazione e si riducono dopo appropriata antibiotico terapia. ⁴⁸

L'Elastasi Neutrofila (NE), una serin-proteasi rilasciata dai granuli neutrofili primari è risultata elevata nelle vie aeree dei pazienti FC precocemente, e livelli più alti nell'escreato sono stati associati ad un più rapido declino della funzione respiratoria e alla presenza di bronchiectasie.

Essa è responsabile del danno diretto alle vie aeree tramite la distruzione dell'elastina e delle componenti strutturali tissutali e dell'attivazione della metallo proteinasi (MMP)-9 che è coinvolta nella capacità di tras migrazione dei neutrofili; inoltre essa, clivando le opsonine e i recettori necessari alla fagocitosi, rende quest'ultima inefficace.^{29,49-51}

FC è inoltre caratterizzata da una disregolazione nella risposta immunitaria innata ed adattativa, con aumento nel BAL dei macrofagi alveolari e delle chemochine e dell'espressione di TLR-4 sui monociti circolanti anche in assenza di infezione.⁵²

I neutrofili tendono ad accumularsi sulla superficie dell'epitelio respiratorio, anche per l'over-espressione di molecole di adesione intracellulare;⁵³ inoltre esprimono sulla loro superficie TLR-4 e producono citokine pro infiammatorie in eccesso, anche in assenza di stimolo infettivo, non sono in grado di aumentare la secrezione in risposta al lipopolisaccaride, né di reprimerla in risposta ad IL-10.⁵⁴

I linfociti T sono elevati nelle vie aeree in FC e producono IL-2 e IL-17, coinvolta nel reclutamento neutrofilo, fin dalla precoce malattia polmonare.^{55,56}

Nell'infiammazione in FC sono infine coinvolti numerosi stimoli estrinseci quali organismi infettivi, succhi gastrici, proteasi, radicali di ossigeno.³⁷

L'infezione batterica stimola un'intensa risposta neutrofila, sproporzionata rispetto all'insulto infettivo, ma inefficace nell'eradicazione dell'infezione;^{36,57} la diversità batterica presente in FC può esacerbare la risposta infiammatoria.⁵⁸

Le infezioni virali possono predisporre all'infezione batterica e scatenare la risposta infiammatoria.⁵⁹

Le infezioni fungine delle vie aeree sono sotto diagnosticate ma possono determinare una risposta infiammatoria Th2 e la secrezione delle proteine chemotattiche monocitarie.⁶⁰

I markers dell'infiammazione delle vie aeree sono stati associati al reflusso gastroesofageo ed alla microaspirazione polmonare del contenuto gastrico nei pazienti con alti livelli di pepsina nel BAL o di acidi biliari nell'escreato.⁶¹

La ridotta difesa dal danno ossidativo è stata ritrovata anche nei lattanti e nei bambini con FC, associate a maggiori livelli di infiammazione delle vie aeree.⁶²⁻⁶³

Il danno strutturale significativo alle vie aeree è dovuto soprattutto al danno ossidativo e all'azione delle proteasi associato con l'infiammazione;⁴⁷ i mediatori neutrofili come MMP-9 e NE sono rilasciati nella risposta neutrofilia e nella morte cellulare, e uno squilibrio tra proteasi ed

antiproteasi esiste nel polmone con FC, dato che in FC il rilascio di NE dai neutrofili esposti al TNF e all'IL-8 è maggiore che nei neutrofili di controllo.⁶⁴

4.2 L'Ossido Nitrico in Fibrosi cistica

L'ossido nitrico (NO) gioca un ruolo critico nella regolazione della funzione delle vie aeree ed è coinvolto in diversi processi che coinvolgono quest'ultime, quali l'infiammazione; NO esalato (Fe) è stato descritto come un utile marker non invasivo dell'infiammazione polmonare in malattie come l'asma.⁶⁵⁻⁶⁶

L'NO è generato a partire dall'arginina da tre isoforme di Ossido Nitrico Sintetasi (NOS), gli isoenzimi nella forma costitutiva (cNOS), che includono NOS neuronale (NOS1), ed endoteliale (NOS3), attivati dagli ioni calcio a produrre ridotte quantità di NO, e la forma inducibile (NOS2), aumentata in presenza di infiammazione, che produce grandi quantità di NO indipendentemente dall'influsso di ioni calcio.⁶⁷

Un'aumentata espressione di NOS2 è descritta nelle vie aeree e nelle cellule epiteliali dei pazienti con asma⁶⁸ e con BPCO.⁶⁹ L'aumento dell'NO esalato nei pazienti asmatici è descritto, in associazione ad infiammazione eosinofila e risposta agli steroidi.⁷⁰

Lo stress ossidativo origina l'anione superossido che in combinazione con NO, può condurre alla formazione di perossinitrito, forma altamente reattiva, aumentata nel condensato dell'esalato (EBC) dei pazienti con BPCO.

A differenza dell'asma, l'espressione di NOS2 è ridotta nell'epitelio delle vie aeree in FC, nel modello murino⁷¹ e nei pazienti.⁷²

In FC sembra esserci un difetto primario nella produzione di NO e studi su cellule tracheali umane in vitro e in topi deficitari di CFTR, hanno mostrato che la perdita di funzione di CFTR risulta nella ridotta espressione di NOS2 epiteliale e nella minor generazione di NO.^{73,74}

La ridotta attività di STAT1 è responsabile della down-regolazione dell'ossido nitrico sintetasi di tipo inducibile (NOS2), con riduzione dei valori dell'ossido nitrico NO, il quale ha una precoce attività battericida, danneggiando così le difese dell'ospite verso le infezioni⁷⁵.

Sono stati riportati in FC concentrazioni sia maggiori che minori di NO alveolare^{67,76}; FeNO è descritto normale nei lattanti con FC di età compresa tra le 5 e le 114 settimane, ma è dimostrato un decremento età dipendente, suggerendo che i cambiamenti legati all'età nelle vie aeree in FC influenzano le dinamiche di NO nelle vie aeree;⁷⁷ nei bambini più grandi con FC il flusso di NO bronchiale è stato descritto uguale o ridotto, in confronto al dato nei coetanei sani.^{78,79}

Una correlazione negativa è stata evidenziata tra NO esalato e Lung Clearance Index (LCI), misura di distribuzione della ventilazione, nei bambini con FC.⁸⁰

Nei pazienti adulti sono riportati maggiori livelli di nitriti nell'EBC, con livelli di NO marcatamente ridotti, sia nella malattia stabile sia durante le esacerbazioni respiratorie⁸¹, suggerendo che NO esalato non rifletta la produzione totale di NO.

NO nasale è presente a livelli ridotti nei pazienti con FC sin dall'età pediatrica^{74,82} e non sembra esserci alcuna correlazione tra NO esalato e nasale e genotipo, o stato infettivo.^{74,83,84}

Più bassi livelli di formazione di NO sono associati con le mutazioni severe di CFTR, con l'espressione pancreatica della malattia e infezione da P. A..⁸⁵

Poiché alte concentrazioni dei metaboliti di NO, nitrati e nitriti, sono presenti nelle secrezioni delle vie aeree in FC, inversamente correlate alla funzione polmonare, le ridotte concentrazioni di NO esalato nei pazienti FC sono state associate anche alla ritenzione e al metabolismo di NO nelle secrezioni delle vie aeree.⁸⁶

Inoltre NO reagisce con altre sostanze prodotte dalle cellule infiammatorie nel fluido delle vie aeree come i superossidi, con la produzione di perossinitrito.⁸⁴

L'aumentata degradazione di NO è stata inoltre messa in relazione con la capacità di inattivazione di NO da parte della piocianina prodotta da P. A..⁸⁶

La limitazione alla diffusione di NO nel lume delle vie aeree a causa delle secrezioni dense caratteristiche di FC, va tenuta in considerazione, ed un aumento del volume delle secrezioni nelle vie aeree potrebbe ridurre la concentrazione di NO nell'aria esalata; la correlazione positiva riscontrata tra FeNO e le misure spirometriche nella FC stabile parrebbe coerente con questa speculazione, data l'aumentata ritenzione di muco presente nella malattia polmonare avanzata.⁷⁴

Inoltre l'ostruzione degli ostia dei seni nasali in FC può spiegare i ridotti livelli di NO nasale, la cui diffusione appare bloccata.⁸⁴

4.3 I metaboliti dell'arginina in Fibrosi Cistica

La relazione di NO con il suo precursore arginina ed i suoi derivati è stata recentemente studiata nell'infiammazione ed ha portato a promettenti risultati soprattutto nell'asma.

L'aminoacido semiessenziale L-arginina è il substrato di NOS nella generazione di NO e citrullina. L-arginina è inoltre substrato dell'arginasi, dalla quale è idrolisata a ornitina ed urea. I due enzimi sono soggetti ad una co-regolazione negativa reciproca.

Esistono due forme conosciute di arginasi, entrambe espresse nel polmone, ed un aumento dell'attività dell'arginasi è riportato nell'ipertensione polmonare⁸⁸ e nelle malattie polmonari ostruttive.⁸⁹

Il ruolo dell'inibitore competitivo endogeno di NOS, Dimetilarginina asimmetrica (ADMA), della Dimetilarginina simmetrica (SDMA) e di N-monometilarginina (NMMA) è stato indagato.

ADMA è un derivato metilato dell'arginina, generato dalla proteolisi di proteine contenenti residui arginici metilati, in seguito all'azione di protein metiltrasferasi (PRMT); esso subisce eliminazione renale e metabolismo da parte dell'enzima dimetilarginina dimetilaminoidrolasi (DDAH) a L-citrullina e dimetilamina.⁹⁰

ADMA si comporta come un inibitore endogeno sulle NOS, grazie alla sua competizione con il substrato L-Arginina. Anche se livelli elevati di ADMA possono inibire tutte le forme di NOS in modo diverso, essi inibiscono preferibilmente la produzione di NO mediata dalle forme costitutive di NOS. Inoltre ADMA può disaccoppiare NOS spostando il bilancio di produzione di NO verso la generazione di ROS e a fenomeni di nitrossidazione⁹¹, che agiscono da stimolo sull'espressione di NOS2.^{92,93} ROS e RNS, rappresentano dei potenti agenti ossidanti che possono modulare lo sviluppo di infiammazione cronica con rimodellamento delle vie aeree in diverse patologie respiratorie.⁹³

Inoltre bisogna considerare che ADMA, inibendo NOS, aumenta la disponibilità di L-arginina per le arginasi, con produzione di ornitina.⁹⁴

ADMA è stata associata all'alterazione del pathway di NO e alla disfunzione endoteliale nelle malattie vascolari⁹⁵, e se ne è dimostrato un ruolo come fattore di rischio cardiovascolare⁹⁶, con livelli plasmatici elevati di ADMA nell'ipertensione⁹⁷, ipercolesterolemia⁹⁸, diabete mellito di tipo 2⁹⁹, iperomocisteinemia¹⁰⁰ ed insufficienza renale terminale.¹⁰¹

Il polmone è riconosciuto un'importante fonte di ADMA, influenzandone i livelli circolatori¹⁰², ed un ruolo di ADMA nella patogenesi delle malattie respiratorie è stato ipotizzato, data l'importanza di NO in quest'ultime.

L'infusione sottocutanea di ADMA in topi durante test in vivo, ha condotto a minor produzione di NO in confronto all'infusione di soluzione fisiologica, con conseguente ridotta broncodilatazione ed aumentata deposizione di collagene nei polmoni. Questo ultimo effetto è dovuto alla stimolazione della via dell'arginasi che produce ornitina e rende maggiormente disponibili le poliamine e la prolina, responsabili di una maggiore proliferazione cellulare e della deposizione di collagene, evidenziando dunque un ruolo di ADMA anche nel rimodellamento delle vie aeree, tipico di numerose patologie polmonari croniche quali BPCO, fibrosi polmonare e asma.⁹⁰

La nebulizzazione di ADMA in topi naïf ha condotto a maggiore iperreattività ed aumento della resistenza delle vie aeree.¹⁰³

In modelli murini di infiammazione allergica delle vie aeree, sono stati riportati elevati livelli di ADMA nel citosol e nei mitocondri delle cellule polmonari, correlati allo stress nitrossidativo. Con tecniche immunostochimiche nello stesso modello è stata indentificata, in particolare nelle cellule bronchiali, una maggiore produzione di PRMT e una ridotta espressione di DDAH rispetto ai topi

controllo, lasciando così ipotizzare che coesistano nell'infiammazione allergica una maggiore produzione di ADMA e un minore suo catabolismo nello stesso tempo. Inoltre essendo PRMT indotta dallo stress ossidativo che ADMA stesso genera, si instaura quindi fra sintesi di ADMA ed espressione di PRMT un circolo vizioso.¹⁰⁴

Nei topi sensibilizzati è dimostrato che ADMA inibisce cNOS, e indirettamente aumenta l'espressione di NOS2, attraverso la produzione di ROS e la stimolazione del pathway NFκB, in questo modo favorendo l'infiammazione.^{92,104} Gli studi su modelli animali dimostrano come l'NO prodotto dall'isoforma inducibile sia, a differenza di quello derivato dalle cNOS, un fattore favorente l'infiammazione, poiché aumenta l'espressione di chemochine e il reclutamento di cellule infiammatorie. A sostegno di ciò infatti l'over espressione di una delle isoforme costitutive come la NOS3 riduce il quadro flogistico in modelli asmatici.⁹²

Nell'omogenato polmonare di modelli allergici murini, i livelli di ADMA sono risultati aumentati ed il rapporto L-arginina/ADMA è risultato minore che negli animali controllo, indicando una alterata attività di NOS.

Nei pazienti asmatici, campioni polmonari hanno mostrato un ridotto rapporto L-arginina/ADMA in confronto con tessuto polmonare sano, ma non si è evidenziata alcuna differenza nell'attività di DDAH. Anche la forma simmetrica SMDA è risultata incrementata a livello del tessuto polmonare ma non nell'escreato; anch'essa potrebbe partecipare al processo di inibizione dell'attività delle NOS, essendo un inibitore competitivo di L-arginina a livello cellulare.¹⁰³

Livelli elevati di ADMA sono stati descritti nell'escreato¹⁰³ e nell'EBC di pazienti pediatriche con asma; non sono state riscontrate associazioni con l'uso di steroidi inalatori, né correlazioni tra i livelli di ADMA rapportati alla tirosina (ADMA/Tir) nell'EBC e i livelli di FeNO, né con le concentrazioni plasmatiche.¹⁰⁵

Uno studio recente ha misurato ADMA nell'escreato dei pazienti con BPCO ed ha dimostrato una correlazione tra ADMA, L-Ornitina, attività dell'arginasi e NO esalato.¹⁰⁶

Il metabolismo delle arginine è stato indagato in pochi studi in FC. L'attività plasmatica dell'arginasi è elevata in FC e si ipotizza un suo ruolo nella ridotta disponibilità di L-arginina per la sintesi di NO in FC.¹⁰⁷

Alti livelli di attività di arginasi sono stati trovati in campioni di escreato dei pazienti FC; inoltre, poiché dopo il trattamento antibiotico l'attività di arginasi è risultata ridotta, in modo inversamente proporzionale alla funzione respiratoria, un ruolo dell'arginasi e della deplezione di L-arginina nell'infiammazione delle vie aeree FC è stato ipotizzato.¹⁰⁸

L'arginasi è costitutivamente espressa nei granuli azzurrofilari dei neutrofili, le cellule che principalmente sono chiamate in causa nel processo flogistico in FC. La correlazione inversa fra la somministrazione di corticosteroidi e l'attività dell'arginasi, conferma il suo ruolo pro-infiammatorio in questi pazienti¹⁰⁸.

La somministrazione di arginina in singola dose in aerosol ha condotto ad un acuto e transitorio miglioramento della funzione polmonare e all'aumento di FeNO in pazienti con FC, per mezzo dell'aumento della sintesi di NO.¹⁰⁹

L'attività arginasica va tenuta in considerazione nel processo di rimodellamento delle vie aeree, nella deposizione di collagene e nella broncoostruzione in FC, vista la conseguente relativa assenza di NO e la compromissione del meccanismo di rilassamento.¹⁰⁸

In un esperimento su cavie si è infatti visto come l'inibizione dell'arginasi causi una riduzione della broncoostruzione al test con la meta colina.¹⁰⁸

In uno studio recente su pazienti FC, concentrazioni misurabili di ADMA sono state descritte nell'escreato. ADMA e SDMA sono risultate più alte, soprattutto nei pazienti esacerbati, in confronto ai controlli sani, ed hanno presentato una riduzione dopo trattamento antibiotico, correlato al miglioramento del FEV¹. Il rapporto ADMA/SDMA, aumentato nei pazienti FC, tendeva a diminuire dopo trattamento. Il rapporto L-arginina/ADMA, indicatore della quota di L-arginina disponibile per NOS, era più basso nei pazienti FC ed in particolare durante esacerbazione, ed aumentava dopo trattamento. Poiché i livelli di DDAH erano più alti prima del trattamento, non si riteneva che gli elevati livelli di ADMA fossero da imputare ad una ridotta degradazione.⁹⁴

Questi dati sembrano suggerire un ruolo di ADMA, quale inibitore endogeno delle NOS, nella deplezione di NO dalle vie aeree, nell'elevata attività dell'arginasi e nel rimodellamento delle vie aeree in FC.

5. L'INFEZIONE IN FIBROSI CISTICA

Le infezioni batteriche rappresentano la più importante causa di morbidità e mortalità nei pazienti affetti da FC.¹¹⁰

Lo squilibrio ionico generato dal difetto di CFTR, responsabile dell'ispessimento del muco delle vie aeree e dell'inefficacia della clearance mucociliare, è alla base delle frequenti infezioni in FC, poiché i batteri trovano nelle secrezioni dense, un habitat ideale per la loro riproduzione.¹¹⁰⁻¹¹⁴

Si è ricercato un ruolo nella promozione dell'infezione anche nella disfunzione del sistema immunitario.

In particolare, la risposta del sistema immunitario innato è rappresentata dall'imponente invasione delle vie aeree e del tessuto polmonare da parte dei granulociti neutrofili, presenti in elevato numero anche nell'escreato e nel BAL;^{115,116} ruolo più marginale è rivestito da eosinofili, linfociti e monociti. Numerose funzioni dei neutrofili sono alterate nel paziente con FC rispetto al paziente sano. Esiste uno squilibrio tra proteasi secrete dai neutrofili, in particolare NE e MMP¹¹⁷, e loro inibitori. Di fronte ad un'infezione persistente l'eccessiva liberazione di questi enzimi conduce alla distruzione delle varie componenti tissutali del parenchima polmonare, generando quadri di enfisema e bronchiectasie e compromettendo irreversibilmente la funzione respiratoria. Anche la funzione fagocitaria, preminente per i neutrofili, risulta alterata.^{35,115,116} Quindi, a livello immunitario, FC determina un deficit della risposta innata coordinata dai neutrofili. Dall'altro lato la risposta immunitaria acquisita è regolata in senso pro-infiammatorio, determinando la produzione di citochine che favoriscono l'infiammazione, tra cui IL-6, IL-8, IL-17 e IL-1 β ; risulta invece ridotta la produzione di citochine anti-infiammatorie.³⁵

La risposta immunitaria determinata dai linfociti Th2, tramite la produzione di citochine (IL-4, IL-9, IL-13) che inducono la produzione di muco per effetto diretto sulle cellule epiteliali, favorisce l'infezione in una sorta di circolo vizioso.¹¹⁸

5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Durante l'infanzia i principali microorganismi patogeni sono *Haemophilus Influenzae* e *Staphylococcus Aureus*. Nei pazienti adulti si trovano più frequentemente Gram negativi (*P.A.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*) e micobatteri atipici.¹¹⁹

Da uno stadio iniziale di assente colonizzazione, si passa ad uno stadio di infezione intermittente, per giungere a quello finale di infezione cronica.

Le infezioni da *S. aureus* e *P.A.* si presentano con frequenza maggiore che nei soggetti sani.

La prevalenza dell'infezione da P.A. nelle colture del tratto respiratorio varia tra le fasce d'età, da 10-30% nella fascia 0-5 anni, all'80% al di sopra dei 18 anni.¹²⁰

L'infezione intermittente è tipica dell'età pediatrica¹²¹, quella cronica invece è meno frequente nei pazienti pediatrici, e tende a prevalere dopo i diciotto anni e si caratterizza per lo sviluppo di colonie di batteri multi-resistenti.^{28,121}

P.A. è un bacillo gram negativo, appartenente al genere *Pseudomonas*, aerobio/anaerobio facoltativo, non fermentante, asporigeno, reso mobile dalla presenza di 1-3 flagelli unipolari.

Possiede una spessa capsula costituita da un esopolisaccaride mucoide rivestito di alginato, che impedisce la fagocitosi e permette l'adesione.

Il principale fattore di virulenza è l'esotossina A e la produzione di endotossina è responsabile dei quadri infiammatori tissutali e dello shock settico che si verifica in corso di batteriemia.

È un germe che predilige gli ambienti umidi e può trovarsi nel suolo, nell'acqua, nelle tubature idrauliche.¹¹⁶ È molto diffuso sia nell'ambiente naturale sia in quello ospedaliero e, in quest'ultimo, può causare vere e proprie epidemie.

P.A. agisce come batterio opportunistico ed è il principale responsabile di infezione cronica delle vie aeree nei pazienti con FC, determinando con la sua colonizzazione, un aumento di morbidità e mortalità, contribuendo al progressivo ed irreversibile declino della funzione respiratoria.

Il motivo della predominanza di P.A. tra i patogeni in FC non è stato chiarito. Un'alterata capacità di killing dei macrofagi nei pazienti con FC è emersa, probabilmente legata alle alterazioni CFTR-dipendenti nelle interazioni tra P.A. opsonizzato e i monociti.^{122,123}

I soggetti con FC sono predisposti rispetto agli individui sani ad essere colonizzati da P.A. anche per l'incapacità delle cellule epiteliali di internalizzare e distruggere il batterio, per la inattivazione dei naturali peptidi antibatterici (difensine) dovuta all'alta concentrazione di sodio e per la perdita dell'attività ciliare per azione della Piocianina, il pigmento caratteristico prodotto da P.A.¹²⁴

È stato inoltre proposto un ruolo di CFTR come recettore per P.A., con un ruolo nell'avvio di una risposta infiammatoria rapida e autolimitantesi, basata sull'influsso neutrofilo guidato da IL-1b e il pathway NF- κ B.^{113,125} Questi meccanismi, risultando alterati in FC,^{126,127} potrebbero condurre a un ritardo nella clearance iniziale, consentendo agli agenti patogeni sufficiente tempo per permanere nel muco ispessito e trarne un vantaggio replicativo.¹¹³

Il ceppo di P.A. inizialmente acquisito, origina dall'ambiente, anche se la trasmissione interumana è stata descritta nelle epidemie.^{113,128}

L'avvio della colonizzazione cronica viene spesso ritardato tramite aggressivo trattamento antibiotico. La reinfezione è spesso determinata da ceppi diversi, anche se nel 25% dei casi si riscontra lo stesso genotipo, legato ad una persistente fonte ambientale, o ad un reservoir nel

paziente.^{129,130} Esiste infatti una forte correlazione tra la colonizzazione dei seni paranasali e la successiva colonizzazione del polmone ad opera degli stessi, anche dopo il trapianto.¹¹⁹

Alla fase di infezione intermittente succede la colonizzazione cronica.

Durante quest'ultima è descritto un iniziale periodo di adattamento, seguito da una transizione nel profilo genico determinata dalla necessità di adattamento alle stressanti condizioni esistenti nelle vie aeree FC, come l'infiammazione, lo stress ossidativo, gli antibiotici, i diversi microrganismi.¹¹²

Questa transizione conduce a cambiamenti fenotipici quali la crescita lenta, la perdita di mobilità, la perdita del quorum sensing, l'antibiotico-resistenza, l'iperproduzione del polisaccaride di superficie alginato. Origina in questo modo il fenotipo mucoide, capace di crescita in biofilm e antibiotico resistenza, e associato ad un più rapido declino della funzione polmonare.^{112,131}

Il biofilm è un'aggregazione complessa di microrganismi che producono una matrice adesiva e protettiva aderendo ad una superficie biologica o inerte. In questo caso la matrice extracellulare è composta da esopolisaccaride alginato, DNA e proteine. La transizione in fenotipo mucoide è indotta dall'aumentata espressione del gene mucA, il più importante gene del DNA batterico.¹³²

La formazione del biofilm è stimolata inoltre dall'ambiente anaerobico o microaerofilo idoneo alla proliferazione del batterio generato dal muco ispessito, dalla ridotta secrezione di componenti battericidi nelle vie aeree, dagli elevati livelli di DNA extracellulare e actina.¹³³

L'infezione persistente da parte di P.A. associa alla compromissione del meccanismo della tosse e della clearance muco-ciliare, tramite la produzione di Piocianina, che rallenta il battito ciliare, e lo sviluppo di bronchiectasie con distruzione dell'epitelio bronchiale, favorendo in questo modo l'infezione da parte di altri microrganismi.¹³⁴

6. L'INFIAMMAZIONE INDAGATA ATTRAVERSO I BIOMARKERS: ADMA E METABOLITI CORRELATI

6.1 Background

Attuali conoscenze sui marker di infiammazione in FC e le matrici su cui eseguire le indagini

Le indagini condotte in FC non hanno identificato un biomarker infiammatorio, capace di predire l'efficacia clinica di un trattamento.³⁷

Tra i marker sierici investigati, PCR, IL-6 e calprotectina hanno mostrato una correlazione con l'esacerbazione respiratoria, con il punteggio clinico, LCI e l'imaging in una popolazione FC con età maggiore ai 10 anni.^{135,136}

Nell'ambito delle malattie polmonari, un aspetto peculiare è però la possibilità di campionamento della matrice studiata direttamente dall'organo interessato. Un lavoro del nostro gruppo sull'asma, ha evidenziato un'assenza di correlazione tra i livelli plasmatici e nell'EBC di ADMA, suggerendo la necessità di svolgere analisi su matrici che possano riflettere i processi patologici regionali.¹⁰⁵

Tra le matrici più rappresentative del milieu polmonare, vi è il BAL, che è però limitato dalla sua natura invasiva; l'escreato è un metodo ben standardizzato, agevole nei bambini più grandi, ma difficile da applicare nei più piccoli. Studi sull'escreato indotto ne mostrano un profilo di sicurezza maggiore rispetto al BAL e in FC cambiamenti nella sua composizione, in particolare l'elastasi libera, hanno mostrato correlazione con i cambiamenti nella funzionalità respiratoria.¹³⁷

L'escreato in FC ha alto contenuto di citochine TH1, TH2, e chemochine; IL-1b, IL-6, IL-8, IFN-c, TNF-a e MCP-1 hanno mostrato correlazione inversa al FEV₁ e FVC.¹³⁸

La riproducibilità del metodo è però ancora controversa, in particolare nei bambini.

Il condensato ottenuto dall'esalato (EBC) è un fluido biologico costituito per il 99% da vapore acqueo e per la restante frazione da gocce respiratorie contenenti molecole non volatili, rappresentative delle caratteristiche del fluido di superficie delle vie aeree.¹³⁹

L'analisi dell'EBC è considerata una tecnica sicura, non invasiva e agevolmente ripetibile, non richiedendo particolare cooperazione da parte del paziente.¹⁴⁰ E' stata agevolmente eseguita dai bambini al di sopra dei 4 anni e se ne riporta raccolta di successo anche nei lattanti.¹⁴¹

Il limite principale alla misurazione dei biomarkers nell'EBC è la diluizione del campione, che richiede una metodica di analisi sensibile. In precedenza l'utilizzo della tirosina come denominatore in rapporto alle concentrazioni dei metaboliti di interesse è stato un modo di rispondere al problema della diluizione.^{105,142}

Un'altra sfida all'uso di EBC è sicuramente la lunga tempistica di analisi successive alla raccolta, che rende i markers non immediatamente disponibili per l'uso clinico.¹⁴³

Diversi studi sono stati eseguiti sull'EBC in FC. Nell'EBC di FC è stato documentato un pH più basso in relazione alle esacerbazioni, con una minor acidificazione rilevata dopo trattamento.^{144,145}

Pur se alti nei pazienti con FC,¹⁴³ i nitriti non hanno mostrato correlazione con i parametri clinici o funzionali quando monitorati longitudinalmente nel tempo, né hanno predetto le esacerbazioni.¹⁴⁶

I marker di stress ossidativo come la nitrotirosina e i nitrosotoli sono alti, soprattutto nella malattia severa. Anche LTB₄, IL-6 e IL-8 sono risultati più elevati nell'EBC dei pazienti FC; IL-6 e LTB₄ hanno mostrato una riduzione dopo il trattamento antibiotico ma senza alcuna correlazione alla funzione respiratoria; LTB₄ e IL-8 sembrano correlare maggiormente all'infezione da P.A. che da *S. aureus*.¹⁴⁷

Gli eicosanoidi sono stati determinati nell'EBC e l'isoprostano 8 e la prostaglandina E₂ risultano elevati in FC, soprattutto nelle esacerbazioni, correlando inversamente al FEV₁; essi potrebbero rivestire un ruolo come marker di gravità della malattia.¹⁴⁶

I livelli di MMP-9 inoltre sono aumentati nei bambini con bronchiectasie, correlando alla funzione polmonare e al punteggio HRCT.

Anche i livelli di adenosina e AMP, espressione dell'infiammazione neutrofila, hanno mostrato correlazione con la funzione respiratoria nei lattanti FC.¹⁴⁸

Come illustrato nel capitolo 2, l'infiammazione è un evento centrale in FC e precede l'infezione delle vie aeree e la destrutturazione tissutale.

La storia naturale della malattia polmonare da FC è caratterizzata da ricorrenti episodi di esacerbazione, la cui frequenza di presentazione aumenta con l'età ed influisce sul declino della funzionalità polmonare¹⁴⁹. Nuove conoscenze sulle modalità di insorgenza delle esacerbazioni possono portare ad un miglioramento della comprensione della storia naturale della malattia, alla possibilità di identificare gli stadi precoci e asintomatici dell'esacerbazione con implicazioni per la ricerca di base e clinica.¹⁵⁰

La possibilità di identificare gli stadi precoci e asintomatici dell'esacerbazione polmonare potrebbe portare a un miglioramento nella risposta alla terapia e nella qualità di vita, ma anche a un più preciso inquadramento del paziente, rendendo più mirate le scelte terapeutiche.

Gli interventi sul processo infiammatorio possono limitare il danno alle vie aeree e influenzare l'andamento clinico. Lo stato infiammatorio del polmone può essere definito anche attraverso lo studio di campioni provenienti dall'organo di interesse. Un outcome infiammatorio che guidi gli interventi terapeutici in FC è ancora in corso di ricerca. Il BAL rappresenta il gold-standard tra i materiali provenienti dal polmone, ma il suo uso è limitato dall'invasività. L'utilizzo dell'analisi

dell'escreato ha dato promettenti risultati; essa è attuabile in FC ma è meno fattibile nei pazienti più giovani, non espettoranti o intolleranti all'ipertonica salina in aerosol; inoltre un monitoraggio longitudinale potrebbe aumentare il già pesante carico delle visite di routine. EBC offre un metodo di campionamento direttamente dalle vie aeree sicuro e non invasivo; esso consente la rivalutazione anche in un breve lasso di tempo. Al momento EBC è un metodo ben descritto che consente di approfondire la patobiologia della malattia polmonare.

L'Arginina e i suoi derivati, profondamente coinvolti nel metabolismo di NO, rappresentano un nuovo target di ricerca, data l'importanza dell'alterata regolazione della sintesi di NO nella patogenesi di FC e altre malattie respiratorie. Queste sono state le premesse per investigare i livelli di Arginina e dei suoi derivati nell'EBC dei pazienti FC.

La fattibilità del metodo

La messa a punto e validazione del metodo sull'EBC, svolta presso il Laboratorio di Spettrometria e Metabolomica, ha consentito di disporre di un metodo riproducibile e robusto di dosaggio simultaneo dei metaboliti considerati che consentisse di ovviare ai limiti della matrice EBC legati alla grande diluizione delle sue componenti.

In questo studio è stato utilizzato uno strumento Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC), che consente elevate prestazioni in termini di sensibilità e capacità di separazione dei picchi cromatografici. Questo è stato interfacciato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo dotato di un sistema di ionizzazione tramite elettronebulizzazione. La corsa cromatografica è stata preceduta da un processo di arricchimento on-line eseguito da un auto campionatore, con lo scopo di concentrare il campione ed incrementare la sensibilità analitica.

La matrice analizzata può influire interferendo nell'analisi e conducendo a soppressione o innalzamento del segnale. Questo è stato minimizzato utilizzando standard interni marcati con isotopi stabili, cioè sostanze strutturalmente identiche all'analita ma con più atomi di idrogeno o carbonio sostituiti con i corrispondenti isotopi stabili. Durante le fasi di purificazione, l'analita ed il suo omologo marcato mostrano comportamento identico. In questo modo la co-estrazione risulta più efficiente, con migliorato rapporto segnale/rumore; la quantificazione viene operata calcolando il rapporto tra l'area sottesa al picco dello standard interno, presente in tutti i campioni a concentrazione costante, e l'area sottesa al picco dell'analita in esame.

La validazione di questi processi tramite preparazione di curve di calibrazione, valutazione della riproducibilità su volontari sani è stata messa a punto e descritta.¹⁵¹

6.2 Scopo

Lo scopo dello studio è stato dosare nell'EBC e nel plasma dei pazienti pediatrici con FC ADMA, SDMA, NMMA, Arginina, Omoarginina, Citrullina e Tirosina e confrontarli con i livelli degli stessi in una popolazione sana. Inoltre si è voluto verificare se esistesse una differenza tra pazienti con FC stabile e pazienti con esacerbazione respiratoria e, in questi ultimi, se ci fosse una variazione in seguito alla terapia antibiotica sistemica. Si è voluto anche verificare se esistessero correlazioni tra i dati clinici e i livelli dei metaboliti sopra citati.

Infine, si è voluto valutare se i cambiamenti nei livelli nell'EBC dei diversi metaboliti nei pazienti stabili correlassero con l'esordio di un'esacerbazione respiratoria e con le variazioni di funzionalità respiratoria.

6.3 Materiali e metodi

Sono stati disegnati due studi, con carattere longitudinale. Il primo studio ha posto a confronto due gruppi di pazienti FC con i controlli sani (sarà denominato in seguito "studio di confronto"); il secondo studio ha seguito nel tempo l'andamento di un gruppo di pazienti FC con malattia polmonare stabile (sarà denominato in seguito "studio di follow up"). I protocolli di studio sono stati approvati dal Comitato Etico Provinciale di Treviso.

Studio di confronto

Popolazione in studio

Trentaquattro bambini con FC sono stati arruolati tra i pazienti seguiti presso l'UOS FC di Treviso e tra i ricoverati in UOC Pediatria di Treviso. Il consenso informato è stato ottenuto in forma scritta dai genitori prima della partecipazione del bambino allo studio.

Sono stati applicati i seguenti criteri di inclusione ed esclusione.

Criteri di inclusione

- Diagnosi documentata di FC (test del sudore positivo e/o mutazioni genetiche determinate)
- Consenso informato da parte del legale rappresentante
- Capacità di eseguire spirometria
- FEV1 medio degli ultimi sei mesi > 70% pred

Criteri di esclusione

- Colonizzazione da *B. cepacia*
- Soggetto non compliant alla terapia usuale
- Soggetto che è stato sottoposto a trapianto polmonare
- Soggetto con Aspergilloso Bronco Polmonare Allergica
- Steroidi sistemici nelle quattro settimane precedenti l'arruolamento

I soggetti in studio sono stati suddivisi in due gruppi, soggetti con malattia stabile e soggetti con esacerbazione respiratoria come di seguito spiegato. L'esacerbazione respiratoria è stata definita nel modo seguente¹⁵²: necessità di terapia antibiotica addizionale in seguito ad almeno due tra:

- cambiamento nel colore e/o volume sputo
- aumento della tosse
- aumento del malessere, stanchezza, letargia
- anoressia o perdita di peso
- riduzione $\geq 10\%$ della funzione polmonare/ cambiamenti radiografici
- aumento della dispnea

Si definisce malattia stabile quella dei pazienti che:

- non hanno richiesto nessuna variazione nell'utilizzo di farmaci orali (compresa l'azitromicina) o per via inalatoria compresi antibiotici (es. tobramicina, colimicina) o di Dnase o di qualsiasi altro tipo di terapia nelle 4 settimane antecedenti l'arruolamento
- non abbiano avuto esacerbazioni respiratorie nelle 2 settimane precedenti l'arruolamento
- non evidenziano variazioni delle colonizzazioni dell'escreato (in particolare acquisizione di P. A.) negli ultimi sei mesi.

I pazienti arruolati sono risultati distribuiti come segue: 21 pazienti con malattia polmonare stabile, e 13 pazienti con esacerbazione.

È stato inoltre arruolato e accoppiato per sesso ed età un gruppo di controllo di 36 bambini sani, non fumatori, senza storia di asma o di malattia respiratoria cronica, non affetti da infezione del tratto respiratorio da almeno un mese prima dell'arruolamento. Di questi, in 20 è stato raccolto un campione di plasma, in 16 è stato raccolto un campione di EBC.

Disegno dello studio

Lo studio ha un disegno prospettico. I pazienti stabili sono stati arruolati consecutivamente durante le visite di routine, mentre i pazienti esacerbati sono stati arruolati entro 48 ore dal ricovero o dalla diagnosi di esacerbazione.

In tutti i pazienti al momento dell'arruolamento sono raccolti l'anamnesi, l'esame obiettivo, l'auxometria, viene misurato il FeNO, sono effettuati la spirometria, i test microbiologici sull'escreato (esame colturale) e gli esami ematochimici di routine (PCR, VES). Il condensato dell'esalato (ottenuto dopo 20 minuti di raccolta con pinza nasale) e un campione di plasma sono stati raccolti e stoccati in congelatore a -80°C .

Tutte le analisi sopracitate sono state ripetute nei pazienti con esacerbazione anche dopo l'esecuzione della terapia antibiotica, secondo lo schema in Tabella 1.

	T ₀	T ₁	T ₂ Solo per i pazienti con esacerbazione
Verifica criteri inclusione/esclusione	*		
Verifica criteri di malattia stabile/esacerbazione	*		
Consenso Informato, Consegna note informative	*		
Dati anagrafici		*	
Raccordo anamnestico		*	
Esame obiettivo generale/auxometrico		*	*
HR/SpO ₂		*	*
Spirometria		*	*
Coltura dell'escreato		*	*
Misurazione dell'NO		*	*
Raccolta del condensato dell'esalato e del plasma		*	*
Esami ematochimici		*	*
Dati anamnestici sull'intervallo tra T ₁ e T ₂			*

Tabella 1. Procedure ed analisi eseguite nello studio confronto.

Strumentazione per la raccolta dell'EBC

L'EBC è stato raccolto e processato in accordo con le raccomandazioni dell'ATS/ERS.¹⁴⁰ La raccolta è effettuata utilizzando l'apparecchio TURBO-DECCS (transportable unit for research on biomarkers obtained from disposable exhaled breath condensate collection system, Medivac®, Parma, Italy).

Il condensatore ha un sistema di refrigerazione controllato tramite un termostato che consente di impostare la temperatura di lavoro e sfrutta un circuito monouso di raccolta DECCS 04 ST costituito da un boccaglio, una valvola a una via e un filtro per la saliva collegati a una provetta di raccolta (50 ml) mediante un tubo.

Il bambino respira a volume corrente per 20 minuti, seduto in modo confortevole e utilizzando una pinza nasale. I campioni di EBC sono stati stoccati in tubi di polipropilene a -80°C fino all'analisi.

Analisi dell'ADMA e dei metaboliti correlati

ADMA e i metaboliti correlati sono stati misurati al Laboratorio di Spettrometria di massa e Metabolomica, Istituto per la Ricerca Pediatrica (IRP) "Città della Speranza", Università degli Studi di Padova. Arginina (Arg), omoarginina (H-Arg), ADMA, SDMA, NMMA, citrullina (Cit) e tirosina (Tyr) sono stati quantificati simultaneamente, tramite un metodo di cromatografia liquida Ultra -Performance e spettrometria di massa tandem (UPLC-ESI-MS/MS).

In sintesi, 500 μL di EBC addizionati a 50 μL di soluzione di metanolo con standard interni marcati sono stati portati a evaporazione sotto un flusso di azoto a 30° . I metaboliti sono stati convertiti ai loro esteri butilati tramite l'aggiunta di 150 μL di soluzione di butanolo contenente 5% v/v di cloruro di acetile e il riscaldamento a 60° per 20 minuti. Le separazioni dopo arricchimento on-line sono state prodotte su una colonna BEH C18 in un sistema UPLC Acquity (Waters Milford, MA, USA) accoppiato a uno spettrometro di massa tandem a triplo quadrupolo Xevo TQ-S (Waters Milford, MA, USA).

L'acquisizione dei dati è avvenuta con software MassLynx 4.1, in seguito processati con TargetLynx (Waters, Milford, MA, USA). ADMA e i suoi metaboliti nell'EBC sono stati misurati ed espressi in termini di rapporto con la tirosina, poiché quest'ultima è considerata un marker per l'aggiustamento della diluizione di EBC.¹⁰⁵

Strumentazione per la misurazione dell'ossido nitrico esalato (FENO)

La misura dell'Ossido Nitrico esalato è stata effettuata con HYPAIR FeNO (Medisoft®, Roma, Italy), utilizzando una metodica online a singolo espirio in accordo con quanto riportato dalle linee guida dell'ERS/ATS.¹⁵³

I bambini inalano aria priva di NO fino alla capacità polmonare totale e successivamente espirano per almeno 6-7 secondi, attraverso un restrittore dinamico di flusso, impostato con un flusso target di 50 ml/sec. La misura è effettuata con l'uso di pinza nasale. L'apparecchio è calibrato usando una bombola di calibrazione con una concentrazione di 200 ppb.

Strumentazione per i test di funzionalità polmonare

La spirometria è eseguita con Jaeger-Carefusion® (Hoechberg, Germany) Masterscope secondo le linee guida ATS/ERS.¹⁵⁴ Almeno tre manovre forzate sono state completate per ogni test e la miglior capacità vitale forzata (FVC), i migliori flusso espiratorio (MMEF) e FEV₁ sono state considerate per l'analisi dei dati.

Analisi statistica

L'analisi è stata condotta con i software MedCalc (versione 11.1.1.0, MedCalc Software, Belgium) e SPSS per Windows (versione 21, SPSS IBM, New York, USA). I dati Normalmente distribuiti (parametri spirometrici, frequenza cardiaca [HR], saturazione di ossigeno [SpO₂], esami del sangue, il dosaggio dei metaboliti nel plasma e i rapporti Arg/ADMA e ADMA/SDMA) sono stati espressi come medie e DS. I dati non Normalmente distribuiti (ADMA e gli altri metaboliti nell'EBC, sia in valore assoluto che come rapporto alla tirosina) sono stati espressi come mediana e range interquartile (IQRs).

I due gruppi sono stati comparati con il t-test per dati non appaiati e per dati appaiati nel caso dei dati Normalmente distribuiti. I test di Mann-Whitney e di Wilcoxon sono stati impiegati per i dati non Normalmente distribuiti, indipendenti e appaiati, rispettivamente.

Le correlazioni sono state testate con il test di correlazione di Spearman.

La significatività è stata stabilita per $p < 0.05$.

Studio follow-up

Popolazione in studio

Una coorte di 7 pazienti stabili dal punto di vista clinico e terapeutico è stata arruolata durante le visite routinarie. Si sono applicati i criteri di inclusione ed esclusione seguenti.

Criteri di inclusione

- Diagnosi documentata di FC (test del sudore positivo e/o mutazioni genetiche)
- Consenso informato da parte del legale rappresentante
- Capacità di eseguire spirometria
- FEV₁ medio degli ultimi sei mesi > 70%

Criteri di esclusione

- Colonizzazione da *Burkholderia cepacia*
- Soggetto non compliant alla terapia usuale
- Steroidi sistemici nelle quattro settimane precedenti l'arruolamento
- Aspergillosi Bronco Polmonare Allergica
- Pazienti che hanno richiesto variazione nell'utilizzo di farmaci orali (compresa l'azitromicina) o per via inalatoria compresi antibiotici (es. tobramicina, colimicina) o di Dnase o di qualsiasi altro tipo di terapia nelle 4 settimane antecedenti l'arruolamento
- Pazienti che hanno avuto esacerbazioni respiratorie nelle ultime 2 settimane prima dell'arruolamento
- Pazienti che hanno evidenziato variazioni delle colonizzazioni dell'escreato negli ultimi sei mesi (in particolare acquisizione di P.A.)
- Soggetto che è stato sottoposto a trapianto polmonare

Disegno dello studio

Lo studio è di tipo longitudinale. I pazienti sono stati seguiti ad intervalli regolari a cadenza mensile (30 +/- 2 giorni), fino allo sviluppo di un'esacerbazione, o altrimenti fino ad un periodo totale di osservazione di sei mesi.

All'arruolamento, dopo l'ottenimento del consenso informato scritto del genitore e alla verifica dei criteri di inclusione/esclusione, per tutti i pazienti sono state raccolte le notizie anamnestiche, l'esame obiettivo, i parametri vitali, l'auxometria, è stato misurato il FeNO, e sono stati effettuati le prove spirometriche e i test microbiologici sull'escreato (esame colturale). L'EBC (ottenuto dopo 20 minuti di raccolta con pinza nasale) è stato raccolto e stoccato in congelatore a -80°C.

Ai successivi controlli mensili, sono state ripetute tutte le misurazioni, secondo lo schema contenuto in Tabella 2.

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Verifica criteri inclusione/esclusione	*					
Consenso Informato, Consegna note informative	*					
Dati anagrafici	*					
Raccordo anamnestico	*	*	*	*	*	*
Verifica criteri di esacerbazione		*	*	*	*	*
Esame obiettivo generale/auxometrico	*	*	*	*	*	*
HR/SpO ₂	*	*	*	*	*	*
Spirometria	*	*	*	*	*	*
Coltura dell'escreato	*	*	*	*	*	*
Misurazione dell'NO	*	*	*	*	*	*
Raccolta dell'EBC	*	*	*	*	*	*

Tabella 2. Procedure ed analisi effettuate durante lo studio follow-up.

Inoltre, ai controlli a cadenza mensile è stato verificato se il paziente presentava un'esacerbazione polmonare; in caso di riscontro di esacerbazione infatti il paziente non veniva più monitorato a scopo di studio ed usciva da quest'ultimo.

È stata applicata la stessa definizione di esacerbazione dello studio confronto.

Si applicano i medesimi metodi dello studio confronto, relativi alla raccolta dell'EBC, misurazione del FeNO, esecuzione spirometria e analisi di ADMA e dei metaboliti correlati nell'EBC.

Analisi statistica

L'analisi è stata condotta con i software MedCalc (versione 11.1.1.0, MedCalc Software, Belgium) e SPSS per Windows (versione 21, SPSS IBM, New York, USA). I dati Normalmente distribuiti (parametri spirometrici, frequenza cardiaca [HR], saturazione di ossigeno [SpO₂], e i rapporti Arg/ADMA e ADMA/SDMA) sono stati espressi come medie e DS. I dati non Normalmente distribuiti (ADMA e gli altri metaboliti, sia in valore assoluto che come rapporto alla tirosina) sono stati espressi come mediana e range interquartile (IQRs). Sono stati utilizzati il test Kruskal-Wallis e il Mann-Whitney per le comparazioni.

Si è indagata la correlazione tra i diversi dati con il test di correlazione di Spearman.

La significatività è stata stabilita per $p < 0.05$.

6.4 Risultati

Studio confronto

Popolazione in studio

Un totale di 70 soggetti, 34 pazienti con FC e 36 controlli sani sono stati arruolati. Dei 34 pazienti con FC, 21 presentavano malattia stabile, 13 rientravano nei criteri di esacerbazione respiratoria. In Tabella 3 sono mostrate le caratteristiche dei gruppi di pazienti FC. Il gruppo dei controlli sani era caratterizzato da un'età media di 9.78 ± 3.21 anni.

I pazienti inclusi nel gruppo esacerbati avevano un'età maggiore ($p = 0.017$); essi inoltre presentavano un FEV1 medio negli ultimi 6 mesi inferiore ($p = 0.02$). Non sono state riscontrate altre differenze. In particolare, la distribuzione del sesso e le caratteristiche auxometriche sono risultate sovrapponibili; inoltre anche i dati di colonizzazione e le IgE totali sono ben confrontabili; per quanto riguarda l'utilizzo di farmaci antinfiammatori ed antibiotici, pur sembrando maggiore nel gruppo degli esacerbati, non vi è differenza significativa.

Caratteristiche	Tutti i pazienti FC	Malattia stabile	Esacerbati Pre ABT
Soggetti (n)	34	21	13
Età media (SD)	13.94 anni (3.35)	13.05 anni (3.32)	15.38 anni (2.96)
% femmine	52.94	57.14	46.15
Omozigosi $\Delta F508$	8 (23.53%)	6 (28.57%)	2 (15.38%)
Eterozigosi $\Delta F508$	17 (50.00%)	10 (47.62%)	7 (53.84%)
FEV₁ % medio ultimi 6 mesi (SD)	88.98 (12.72)	94.01 (11.61)	80.84 (10.19)
Mediana percentile altezza [IQR]	52.24 [39.42-69.05]	51.89 [40.77-69.05]	47.41 [35.61-75.21]
Mediana percentile peso [IQR]	35.42 [16.87-54.28]	33.79 [19.11-60.83]	38.44 [15.99-53.07]
Colonizzazione da P. A. (%)	6 (17.65%)	4 (19.05%)	2 (15.38%)
IgE medie (SD)	85.15 U.I./ml (125.15)	72.87 U.I./ml (109.45)	104.98 U.I./ml (149.71)
Azitromicina cronica (%)	25 (73.52%)	13 (61.90%)	12 (92.30%)
Antibiotici inalatori	18 (52.94%)	10 (47.62%)	8 (61.54%)
Steroidi inalatori	17 (50.00%)	9 (42.86%)	8 (61.54%)

Tabella 3. Caratteristiche demografiche delle popolazioni studiate.

Dati clinici

In tabella 4 sono riportati i dati clinici nei pazienti stabili e nei pazienti esacerbati prima del trattamento; in Tabella 5 si mostrano i dati clinici nei pazienti esacerbati, prima e dopo trattamento. SpO₂ e HR sono risultati sovrapponibili tra pazienti stabili ed esacerbati prima dell'antibioticoterapia.

PCR e VES sono risultate più alte nel gruppo degli esacerbati prima del trattamento, non significativamente.

La funzione respiratoria, come da criteri di inclusione, era conservata in tutti i pazienti. I dati spirometrici, FEV₁ (P=0.006), FVC (P=0.018), MMEF (P=0.002), Tiffenau (P=0.017) sono risultati più alti nel gruppo degli stabili. I parametri spirometrici FEV₁ (P=0.007), FVC (P=0.025), MMEF (P=0.007), Tiffenau (P=0.018) sono risultati migliorati significativamente nel gruppo degli esacerbati dopo terapia antibiotica.

PCR e VES invece, pur diminuendo dopo trattamento antibiotico, non hanno raggiunto la significatività statistica.

La misurazione di FeNO è stata effettuata solo in alcuni pazienti. FeNO è minore nel gruppo stabile (n=9, 9.21± 5.22 ppb) che negli esacerbati prima del trattamento (n=4, 15.09± 17.86 ppb). Dopo terapia antibiotica nei soggetti esacerbati, tende a diminuire, pur se non significativamente (n=4, 11.74 ± 6.08 ppb; P=0.06).

Parametri valutati	Stabili	Esacerbati preABT	P al t-test
Positività esame clinico	1 pz (4.76%)	12 pz (92.31%)	-
HR	88.57 bpm	89.76 bpm	0.86
SpO ₂	97.89 %	96.69 %	0.09
VES media (DS)	20.41 mm/h (19.85)	31.77 mm/h (13.99)	0.14
PCR media (DS)	0.17 mg/dl (0.42)	0.7 mg/dl (1.12)	0.09
GB medi (DS)	8085 x 10 ⁹ /L (2872)	6250 x 10 ⁹ /L (1039)	0.06
FEV ₁ % pred.(DS)	95.96 (14.96)	75.72 (20.24)	0.003
FCV % pred.(DS)	99.65 (15.38)	84.44 (17.54)	0.014
MMEF % pred.(DS)	80.03 (23.91)	52.27 (22.41)	0.002
Tiffenau medio (DS)	81.71 (6.01)	75.03 (7.89)	0.011
FeNO media (DS)	9.21 (5.22)	15.09 (17.86)	0.36

Tabella 4. Confronto dei dati clinici tra pazienti stabili e pazienti esacerbati prima del trattamento antibiotico

Parametri valutati	Esacerbati preABT	Esacerbati postABT	P al t test
Positività all'esame clinico	12 pz (92,31%)	3 pz (23,08%)	-
VES media (DS)	36.83 mm/h (12.95)	24.83 (13.38)	0.07
PCR media (DS)	0.79 mg/dl (1.25)	0.054mg/dl (0.049)	0.25
GB medi (DS)	6088.33x10 ⁹ /L(1004)	6915 x10 ⁹ /L(3084)	0.48
FEV1 % (DS)	75.72 (20.24)	85.07 (20.04)	0.007
FCV % (DS)	84.44 (17.54)	92.07 (17.18)	0.025
MMEF % (DS)	52.27 (22.41)	63.75 (27.58)	0.007
Tiffenau medio (DS)	75.03 (7.89)	78.97 (10.86)	0.018
FeNO media (DS)	15.09 (17.86)	11.74 (6.08)	0.061

Tabella 5. Confronto dei dati clinici tra pazienti esacerbati prima e dopo terapia antibiotica.

ADMA e i metaboliti correlati nell'EBC

Concentrazioni misurabili di ADMA, SDMA, NMMA, H-arg, Arg, Cit e Tyr sono state trovate in tutti i campioni ed i risultati, espresso in nmol/L sono riportati in Tabella 6.

	Controlli sani (n=16)	Tutti i pz FC (n=34)	FC Stabili (n=21)	Esacerbati PreABT (n=13)	Esacerbati PostABT (n=13)
Arg	104.66 [81.70-122.26]	68.41 [50.93-87.60]	73.12 [53.80-87.82]	60.09 [45.34-82.94]	51.99 [49.47-66.28]
Cit	83.51 [64.19-98.44]	94.97 [75.21-111.54]	97.40 [85.35-115.86]	75.9882 [71.10-99.34]	74.35 [73.24-80.59]
Tyr	216.38 [151.00-292.31]	141.93 [127.49-174.00]	148.19 [127.52-175.35]	134.21 [131.45-174.04]	120.73 [109.79-142.81]
ADMA	2.2324 [1.8407-2.5737]	1.5545 [1.3720-1.8300]	1.6702 [1.3890-1.8460]	1.5468 [1.3495-1.7416]	1.4753 [1.2413-1.6220]
SDMA	0.2439 [0.1988-0.2686]	0.1603 [0.1365-0.2633]	0.1683 [0.1363-0.2138]	0.1587 [0.1473-0.2832]	0.1630 [0.1259-0.1858]
H-Arg	0.0672 [0.0507-0.0762]	0.0322 [0.0254-0.0421]	0.0337 [0.0277-0.0401]	0.0278 [0.0249-0.0475]	0.0386 [0.0295-0.047]
NMMA	1.0415 [0.8017-1.2090]	0.6922 [0.6160-0.8736]	0.7393 [0.6199-0.8840]	0.6744 [0.6146-0.7388]	0.6495 [0.5889-0.7747]

Tabella 6. Valori assoluti in nmol/L dei metaboliti indagati. Dati presentati come mediana e IQR.

Come descritto nei metodi, il confronto tra i diversi gruppi è stato operato rapportando le concentrazioni assolute dei metaboliti alla concentrazione di Tyr.

La Tabella 7 mostra il confronto tra i pazienti FC al momento dell'arruolamento e i controlli sani.

Si evidenzia come i pazienti FC abbiano un rapporto Cit/Tyr più elevato, mentre il rapporto H-Arg/Tyr è risultato maggiore nei controlli sani. Non si evidenziano differenze a livello di ADMA/Tyr.

	Tutti i pz FC (n=34)	Controlli sani (n=16)	P-value
Arg/Tyr	0.4695 [0.4068-0.5304]	0.5204 [0.4197-0.5908]	0.316
Cit/Tyr	0.6419 [0.5738-0.6899]	0.4176 [0.2986-0.5082]	0.00003
ADMA/Tyr	0.0112 [0.0103-0.0120]	0.0114 [0.0090-0.0128]	0.983
SDMA/Tyr	0.0011 [0.0010-0.0012]	0.0012 [0.0011-0.0014]	0.443
H-Arg/Tyr	0.0002 [0.0002-0.0003]	0.0003 [0.0003-0.0004]	0.009
NMMA/Tyr	0.0050 [0.0046-0.0054]	0.0053 [0.0044-0.0058]	0.685

Tabella 7. Rapporti dell'ADMA e degli altri metaboliti con Tyr nei pazienti FC e nei controlli sani, confrontati con test di Mann-Whitney. Dati presentati come mediana e IQR.

L'analisi dei sottogruppi è mostrata in Tabella 8. Confrontando i soggetti stabili con quelli esacerbati prima della terapia antibiotica, emerge un maggior rapporto Cit/Tyr tra gli stabili, mentre non si registrano altre differenze. Confrontando gli esacerbati prima e dopo il trattamento antibiotico si evidenzia maggiore NMMA/Tyr dopo trattamento. Non si evidenziano differenze di ADMA/Tyr tra i gruppi. (Figura 5 e 6)

	Stabili	Esacerbati preABT	Stab vs Esac preABT P-value	Esacerbati postABT	Esac pre vs postABT P-value
Arg/Tyr	0.4864 [0.4188-0.5368]	0.4478 [0.3933-0.5178]	0.338	0.4280 [0.4105-0.4743]	0.880
Cit/Tyr	0.6662 [0.6067-0.7280]	0.5881 [0.4224-0.6594]	0.030	0.5989 [0.5402-0.6354]	0.724
ADMA/Tyr	0.0114 [0.0105-0.0120]	0.0108 [0.0094-0.0117]	0.338	0.011 [0.0106-0.0117]	0.684
SDMA/Tyr	0.0011 [0.0010-0.0013]	0.0011 [0.0010-0.0012]	0.632	0.0012 [0.0011-0.0014]	0.635
H-Arg/Tyr	0.0003 [0.0002-0.0003]	0.0002 [0.0002-0.0003]	0.484	0.0003 [0.0003-0.0003]	0.109
NMMA/Tyr	0.0051 [0.0046-0.0054]	0.005 [0.0044-0.0052]	0.606	0.0054 [0.0049-0.0055]	0.048

Tabella 8. Rapporti dell'ADMA e degli altri metaboliti con Tyr nei pazienti FC stabili e in quelli esacerbati, prima e dopo trattamento antibiotico. Il test di Mann Whitney è stato utilizzato nel confronto stabili ed esacerbati; Wilcoxon signed-rank test è stato applicato nel confronto tra gli esacerbati prima e dopo trattamento. Dati presentati come mediana e IQR.

Il rapporto Cit/Tyr e quello Cit/ADMA sono risultati significativamente più alti nei gruppi di pazienti FC che nei controlli sani (Figura 2). Si è evidenziata differenza tra stabili ed esacerbati, ma non tra esacerbati prima e dopo trattamento antibiotico.

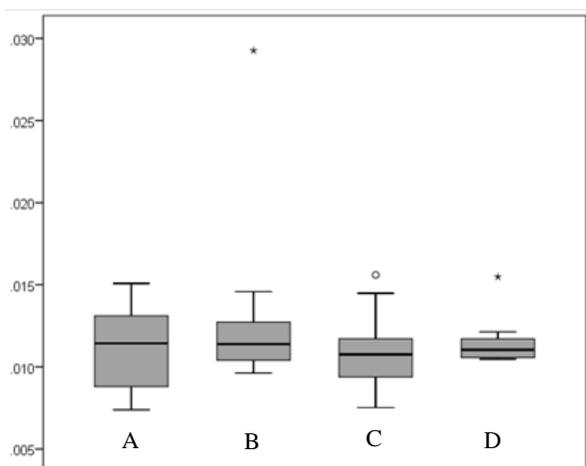


Figura 5. Box plot (mediana e IQR) del rapporto ADMA/Tyr nei controlli sani (A), pazienti FC stabili (B), pazienti FC esacerbati prima (C) e dopo (D) trattamento antibiotico.

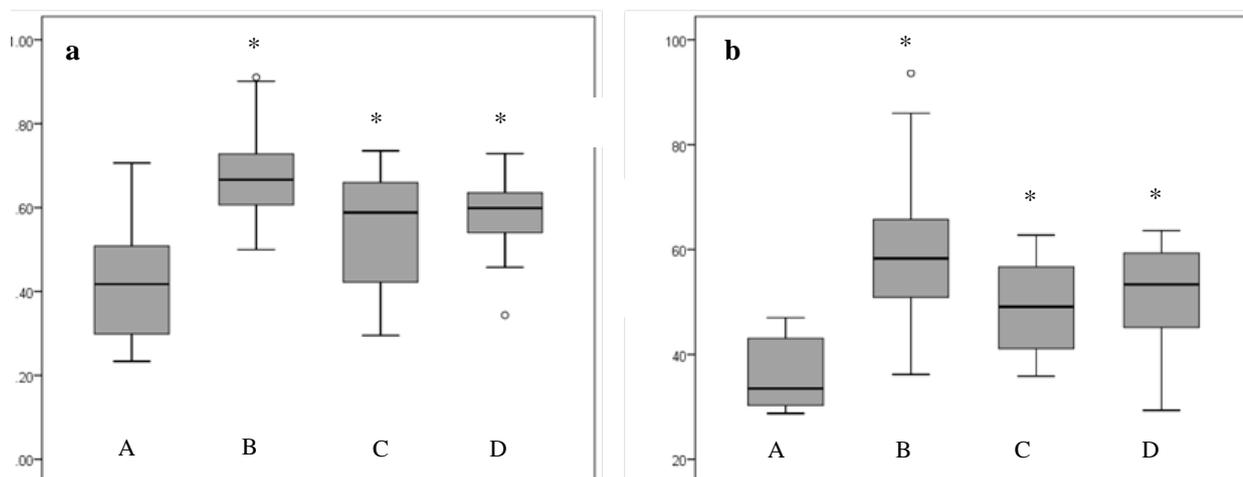


Figura 6. Mediana e IQR dei rapporti Cit/Tyr (Pannello a) e Cit/ADMA (Pannello B) nei controlli sani (A), pazienti FC stabili (B), pazienti FC esacerbati prima (C) e dopo (D) trattamento antibiotico.

Sono stati indagati anche i rapporti Arg/ADMA e ADMA/SDMA, espressione della disponibilità di Arg e dell'equilibrio tra dimetilarginine, rispettivamente.

Il rapporto medio Arg/ADMA (Figura 7) è risultato 42.78 ± 12.31 negli stabili, 40.55 ± 7.16 e 38.70 ± 5.19 negli esacerbati prima e dopo l'antibiotico. I rapporti sono risultati minori nei pazienti, rispetto ai controlli sani (45.21 ± 5.18), e in modo significativo per gli esacerbati dopo trattamento ($P=0.002$).

Il rapporto ADMA/SDMA è risultato 9.20 ± 2.94 negli stabili, 9.61 ± 2.22 e 8.60 ± 2.16 negli esacerbati prima e dopo la terapia antibiotica e 9.13 ± 0.96 nei controlli sani (Figura 8). Non sono emerse differenze tra i due gruppi.

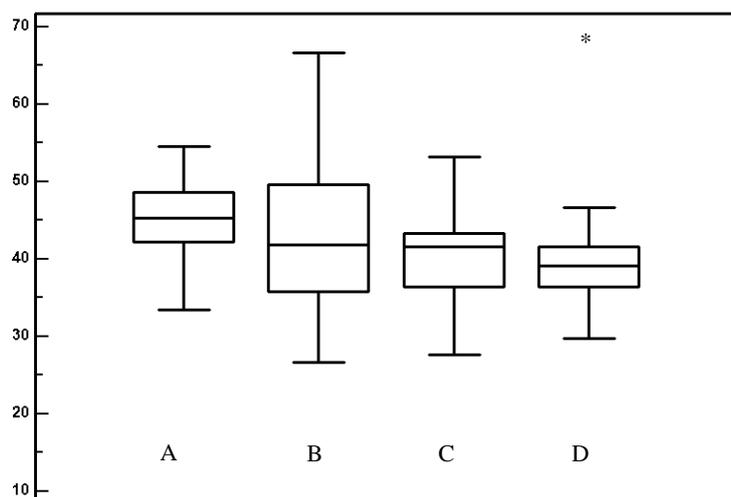


Figura 7. Il rapporto Arg/ADMA nei controlli sani (A), pazienti FC stabili (B), pazienti FC esacerbati prima (C) e dopo (D) trattamento antibiotico.

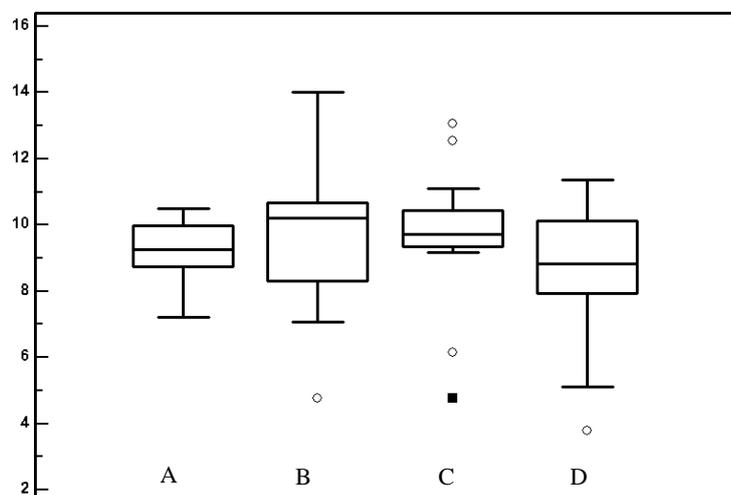


Figura 8. Il rapporto ADMA/SDMA nei controlli sani (A), pazienti FC stabili (B), pazienti FC esacerbati prima (C) e dopo (D) trattamento antibiotico.

Nei pazienti esacerbati sono state calcolate le differenze tra prima e dopo trattamento antibiotico dei rapporti dei vari metaboliti con Tyr. Questi valori sono poi stati correlati ai cambiamenti spirometrici dopo il trattamento antibiotico: una debole correlazione è emersa tra il cambiamento in ADMA/Tyr e SDMA/Tyr e il FEV₁ ($r= 0.498$ and 0.474 , rispettivamente).

Nei pazienti stabili non si è evidenziata alcuna correlazione tra i dati spirometrici e i rapporti dei vari metaboliti con Tyr.

ADMA e i metaboliti correlati nel plasma

Sono stati raccolti i campioni di plasma di 11 pazienti esacerbati, prima e dopo terapia antibiotica, di 19 pazienti stabili e di 20 controlli sani.

Concentrazioni misurabili di tutti i metaboliti studiati sono state misurate in tutti i campioni. Le concentrazioni assolute nei controlli sani e nei pazienti FC sono riportate in Tabella 9 ed espresse in

µmol/L. Si riporta il confronto tra i tre gruppi. I pazienti FC stabili hanno presentato maggiori livelli di Arg, Tyr e NMMA rispetto ai controlli sani. Nei pazienti FC esacerbati Arg, Cit, Tyr, ADMA, NMMA e H-Arg sono risultati maggiori che nei controlli sani (si veda Figura 9 e 10).

	Controlli sani (n=20)	FC Stabili (n=19)	Confronto controlli vs FC stabili	Esacerbati (n=11)	Confronto controlli vs FC esacerbati
Arg	74.51 (18.09)	122.2 (37.4)	P < 0.001	166.6 (50.71)	P < 0.001
Cit	33.69 (6.222).	38.99 (9.322)	ns	43.81 (8.732)	P<0.001
Tyr	83.53 (13.56)	108.2 (32.36)	P< 0.05	115.3 (32.61)	P<0.01
ADMA	1.282 (0.169)	1.254 (0.211)	ns	1.455 (0.200)	P<0.01
SDMA	0.517 (0.089)	0.501 (0.086)	ns	0.519 (0.105)	ns
H-Arg	1.56 (0.382)	2.043 (0.615)	ns	2.279 (0.802)	P< 0.01
NMMA	0.090 (0.014)	0.106 (0.017)	P< 0.05	0.124 (0.024)	P< 0.05

Tabella 9. Concentrazioni dei metaboliti in studio, a livello plasmatico, espresse in µmol/L, come media (SD). Confronto tra i gruppi (ANOVA).

Sono stati calcolati i rapporti Arg/ADMA, Arg/Cyt e NMMA/ADMA che sono risultati minori nei sani che negli FC stabili ed esacerbati (P< 0.001), SDMA/ADMA che è risultato minore negli esacerbati che nei sani (P<0.05), H-Arg/ADMA, più alto negli FC stabili che nei sani (P<0.05)

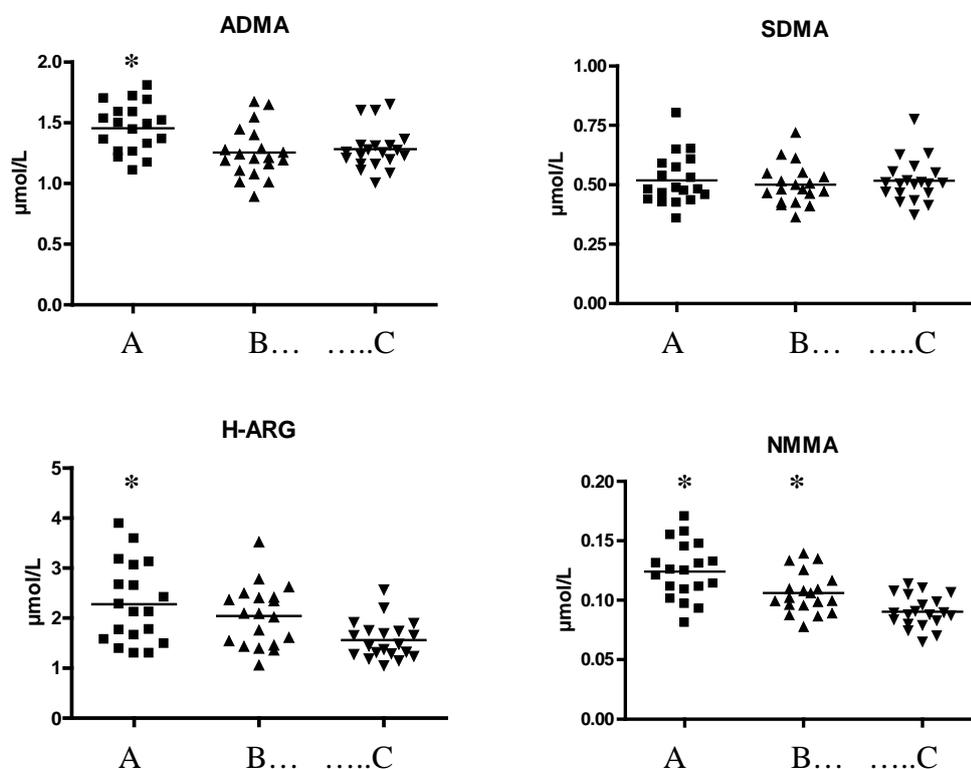


Figura 9. Confronto tra pazienti con FC ed esacerbazione (A), FC stabile (B) e controlli sani (C).

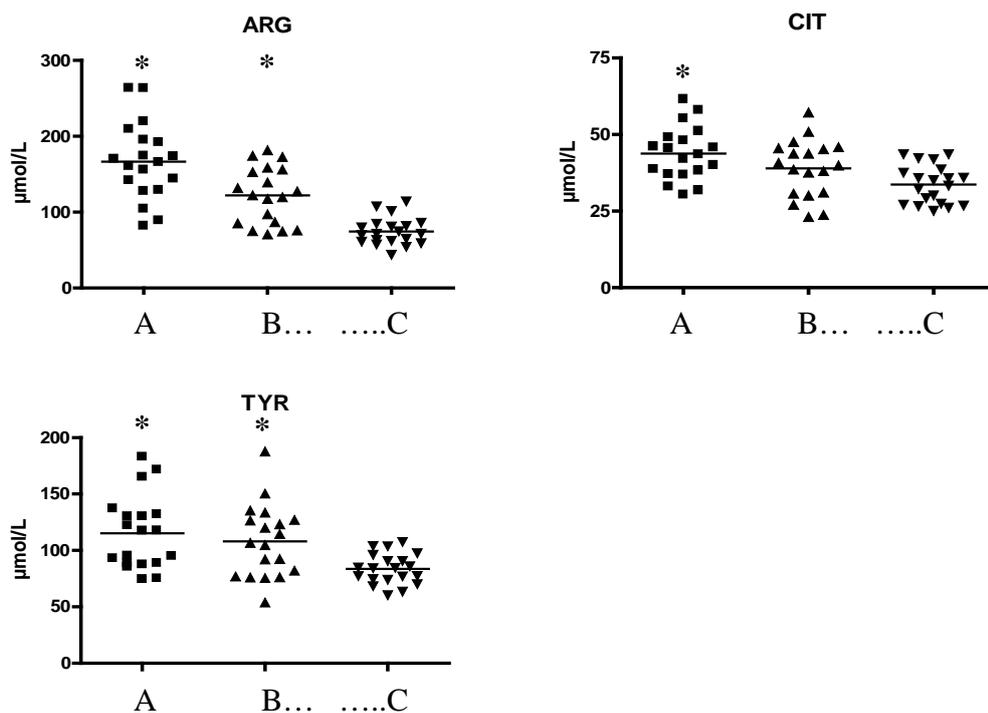


Figura 10. Confronto tra pazienti con FC ed esacerbazione (A), FC stabile (B) e controlli sani (C).

È stato indagato il confronto tra i diversi gruppi di pazienti FC, stabili, esacerbati prima e dopo il trattamento antibiotico, come mostrato in Tabella 10 e Figura 11 e 12. ADMA è risultato più elevato nei pazienti esacerbati prima del trattamento antibiotico; Arg è aumentato dopo trattamento rispetto ai pazienti con malattia stabile.

	Stabili (n=19)	Esacerbati preABT (n=10)	Confronto stabili vs esacerbati preABT	Esacerbati postABT (n=9)	Confronto stabili vs esacerbati post ABT
Arg	122.2 (37.4)	154.5 (58.99)	ns	180 (38.55)	P< 0.01
Cit	38.99 (9.322)	45.8 (10.76)	ns	41.6 (5.552)	ns
Tyr	108.2 (32.36)	110.4 (27.81)	ns	120.7 (38.21)	ns
ADMA	1.254 (0.211)	1.474 (0.195)	P< 0.05	1.434 (0.217)	ns
SDMA	0.501 (0.086)	0.549 (0.118)	ns	0.485 (0.082)	ns
H-Arg	2.043 (0.615)	2.327 (0.862)	ns	2.225 (0.777)	ns
NMMA	0.106 (0.017)	0.123 (0.021)	ns	0.125 (0.028)	ns

Tabella 10. Concentrazioni dei metaboliti in studio, a livello plasmatico, espresse in umol/L, come media (SD). Confronto tra i gruppi (ANOVA).

Sono stati calcolati i rapporti Arg/ADMA, H-Arg/ADMA, NMMA/ADMA, H-Arg/Arg che non hanno evidenziato differenze tra i gruppi, SDMA/ADMA che è risultato più basso negli esacerbati

dopo trattamento che negli stabili ($P < 0.01$), Arg/Cit, che è risultato più alto negli esacerbati dopo trattamento ($P < 0.05$).

Applicando t-test per dati appaiati nel confronto tra FC esacerbati prima vs dopo antibiotico, non si rilevano differenze significative nelle concentrazioni dei metaboliti. Calcolando i rapporti tra metaboliti, si evidenzia dopo antibiotico una riduzione di H-Arg/Arg ($P < 0.05$) ed un aumento di Arg/Cit ($P < 0.01$).

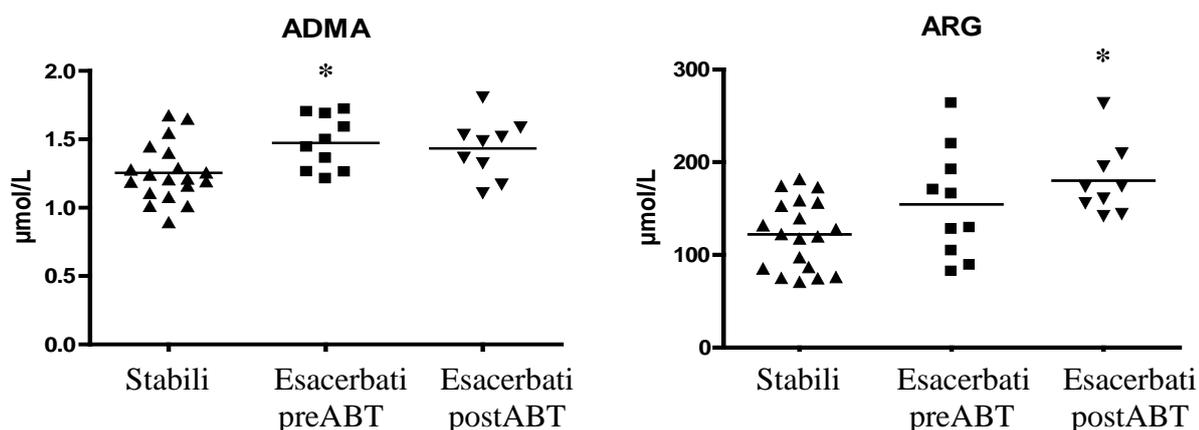


Figura 11 Confronto tra i 3 gruppi di pazienti.

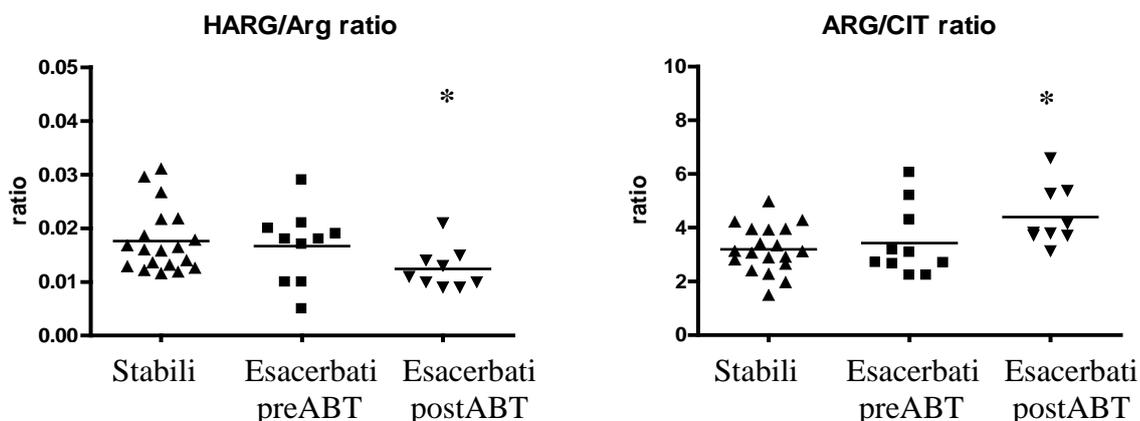


Figura 12. Confronto tra i 3 gruppi di pazienti.

Sono state indagate le correlazioni tra i metaboliti e i parametri clinici. Non si è evidenziata correlazione di Arg con PCR negli esacerbati prima del trattamento, ma si è evidenziata dopo trattamento ($r = 0.81$). ADMA correla inversamente ($r = -0.59$) con PCR prima del trattamento. Cit non ha mostrato alcuna correlazione con PCR negli esacerbati. Nel gruppo degli stabili si è evidenziata una correlazione tra PCR e Cit (-0.53).

Non si sono evidenziate correlazioni con FEV1 né tra i pazienti stabili né tra gli esacerbati.

Le correlazioni tra i vari metaboliti nel plasma hanno mostrato coerenza tra i vari metaboliti, in particolare ADMA correla con Cit, Tyr, SDMA, NMMA; Tyr correla con Arg, ADMA, NMMA. Si veda Tabella 11 per coefficienti di correlazione.

	CIT	TYR	ADMA	SDMA	HARG	NMMA
ARG	0.369	0.545	0.472	0.283	0.267	0.501
CIT	1	0.389	0.660	0.491	0.186	0.380
TYR	0.389	1	0.603	0.158	-0.084	0.633
ADMA	0.660	0.603	1	0.710	0.110	0.823
SDMA	0.491	0.158	0.710	1	0.058	0.321
HARG	0.186	-0.084	0.110	0.058	1	0.103

Tabella 11. Correlazioni tra i metaboliti nell'EBC.

Sono state indagate le correlazioni tra i metaboliti plasmatici e nell'EBC.

Il livello di Tyr plasmatico correla con quello nell'EBC (0.514); la Cit plasmatica correla con ADMA nell'EBC (0.531) e SDMA nell'EBC (0.766).

ADMA nell'EBC e nel plasma correlano (0.526).

H-Arg nell'EBC correla con Cit (0.719), ADMA (0,607), SDMA (0.562), H-Arg (0.531) plasmatici. Arg plasmatica e Arg o Arg/Tyr nell'EBC non correlano.

Studio follow up

Sono stati arruolati nel follow-up 12 pazienti, le cui caratteristiche sono mostrate nella Tabella 12.

Età media (SD)	13,5 (3,63)
Sesso (%F)	44
Omozigosi delF508 (%)	25
CI SweatTest medio (mEq/L)	104,08 (10,71)
FEV1 %pred medio ultimi 6 mesi	97,59 (11,66)
Mediana %ile altezza [IQR]	49.13[41.84-64.08]
Mediana %ile peso [IQR]	20.21[17.27-50.16]
Non colonizzati (%)	41,66
Colonizzazione da P.a. (%)	16,67
Colonizzazione da SAMR (%)	16,67
Azitromicina cronica (%)	75
Steroidi inalatori (%)	58,33

Tabella 12. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti studiati.

I pazienti hanno proseguito lo studio per 5, 4, 5, 3, 2, 3, 2, 5, 4, 4, 5, 3 mesi, rispettivamente. Sono stati analizzati in totale 45 EBC. Si riporta in Tabella 13 il dato riassuntivo di questa analisi.

Metabolita	Mediana [IQR]
Arg	61,0159 [46,8631-86,9469]
Cit	89,6647 [73,3820-115,8690]
Tyr	145,7254 [113.0804-180.6975]
H-Arg	0,0288 [0,0249-0,0424]
ADMA	1,4427 [1,2177-2,0114]
SDMA	0,1542 [0,1187-0,2138]
NMMA	0,6491 [0,5790-0,8968]
Arg/Tyr	0.4330 [0.3908-0.5210]
Cit/Tyr	0.6354 [0.5775-0.7111]
H-Arg/Tyr	0,0002 [0,0002-0,0003]
ADMA/Tyr	0,0107 [0,0100-0,0121]
SDMA/Tyr	0,0011 [0,0009-0,0013]
NMMA/Tyr	0,0049 [0,0046-0,0052]

Tabella 13. Valori assoluti espressi in nmol/L dei metaboliti e loro rapporto con Tyr.

Sette pazienti sono usciti dallo studio per esordio di esacerbazione. L'insieme dei dati relativi alle variabili studiate (esprese come rapporto con la Tyr) nel gruppo dei pazienti che non ha presentato esacerbazione (n=23 EBC) è stato confrontato con quelli dei pazienti stabili dello studio confronto (n=21). Non si sono evidenziate differenze significative.

Il confronto dei dati relativi alle variabili studiate (esprese come rapporto con la Tyr) tra il gruppo che non ha presentato esacerbazione (n=23 EBC) e il gruppo che ha presentato esacerbazione (n=22 EBC), come mostrato in Figura 13, ha evidenziato una differenza significativa in ADMA/Tyr (0.0118 [0.0106-0.0123] nei non esacerbati vs 0.0103 [0.0100-0.0109] nei pazienti che hanno presentato esacerbazione; p=0.024).

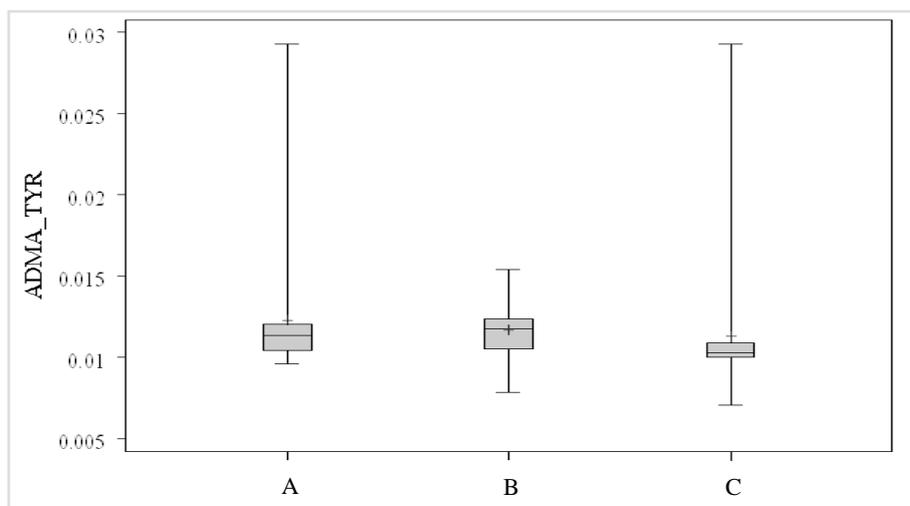


Figura 13. Confronto tra pazienti stabili dello studio confronto (A), pazienti che non hanno presentato esacerbazione nello studio follow up (B), e pazienti che hanno presentato esacerbazione nello studio follow-up (C).

Non si sono evidenziate correlazioni con i valori di FEV₁ e MMEF, né considerando i pazienti dello studio follow-up in toto, né considerandoli suddivisi tra chi ha e chi non ha presentato esacerbazione.

In Figura 14 ho incluso a titolo esemplificativo i grafici di sintesi dell'andamento della funzione respiratoria e di ADMA/Tyr e Cit/Tyr ai diversi timepoint di 4 pazienti, due che hanno presentato esacerbazione (C e D) e due che sono rimasti stabili (A e B). Come si può notare non si evidenzia un concorde cambiamento tra le diverse variabili rappresentate.

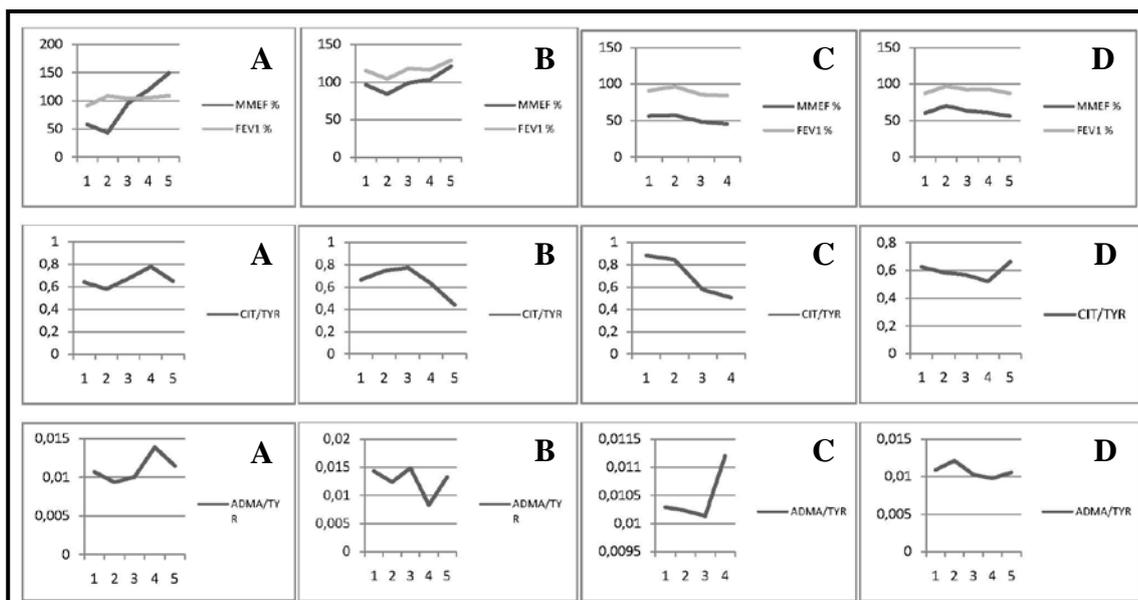


Figura 14. Esempio relativo all'andamento di FEV₁, MMEF, ADMA/Tyr e Cit/Tyr nel follow up di due pazienti che non hanno presentato esacerbazione respiratoria (A e B) e due pazienti che all'ultima visita hanno presentato esacerbazione respiratoria (C e D).

6.5 Discussione

I livelli di ADMA ed aminoacidi correlati sono stati dosati simultaneamente per la prima volta nell'EBC e nel plasma nei pazienti FC.

La metodica utilizzata, inclusa la scelta delle matrici in studio e quantificazione simultanea dei marker mediante un sistema di intrappolamento e arricchimento on-line, associato a cromatografia e spettrometria in tandem (UPLC-MS/MS), è risultata attuabile.^{151,155}

Sono emersi gli aspetti positivi dell'utilizzo di EBC come matrice, quali ripetibilità, minima cooperazione richiesta al paziente ed infine possibilità, a differenza dell'escreato, di essere ottenuto anche nei soggetti più piccoli e senza tosse produttiva.

Le concentrazioni assolute di ADMA nell'EBC sono risultate confrontabili con i dati precedentemente pubblicati.^{105,151} Le concentrazioni assolute di ADMA nel plasma sono risultate dello stesso ordine di grandezza rispetto ai dati pubblicati sul siero.¹⁰⁵

Una correlazione significativa e positiva è stata ritrovata tra le concentrazioni dei diversi metaboliti sia a livello di EBC (Spearman, $0.52 < r < 0.95$, $P < 0.05$), sia nel plasma (Spearman, $0.54 < r < 0.82$, $P < 0.04$), indicando la relazione tra i diversi metaboliti all'interno delle matrici studiate.

Nei bambini con FC, nell'EBC, i livelli di ADMA, inteso come rapporto con Tyr, sono risultati simili a quelli dei controlli sani, ma è emerso un più alto rapporto Cit/Tyr rispetto ai controlli; è risultato invece ridotto rispetto ai controlli sani il valore di H-Arg/Tyr.

Il confronto tra i gruppi di pazienti stabili ed esacerbati, prima e dopo trattamento, non ha mostrato particolari significatività, ad eccezione di Cit/Tyr più elevato negli stabili e NMMA/Tyr che tende ad aumentare dopo antibiotico.

Per valutare gli effetti del trattamento antibiotico, i cambiamenti nelle concentrazioni dei diversi metaboliti tra prima e dopo il trattamento, sono stati calcolati in EBC; il cambiamento della concentrazione di ADMA ha correlato coi cambiamenti degli altri metaboliti, ma non con le variazioni dei parametri spirometrici.

Le concentrazioni di ADMA da noi misurate nell'EBC sono risultate inferiori di un ordine di grandezza rispetto a quelle precedentemente misurate nell'escreato in FC (una mediana di 1.67 nmol/L in EBC vs. 1.53 ± 0.45 $\mu\text{mol/L}$ in escreato, come riportato da Grasemann).⁹⁴ Questo concorda con altri report che mostrano come i markers di stress ossidativo siano trovati in concentrazioni più alte nell'escreato indotto che nell'EBC.^{156,157}

La raccolta di escreato non è stata inclusa nel nostro disegno di studio, quindi non è stato possibile operare un confronto con i livelli nell'EBC e con i dati pubblicati.

Le speculazioni sull'assenza di differenza tra FC e controlli sani per quanto riguarda i livelli dei metaboliti in esame nell'EBC possono essere diverse. Innanzitutto la difficoltà di diffondere dalle basse vie all'esterno in seguito alle secrezioni dense che caratterizzano questa patologia, meccanismo cui è già imputata la ridotta escrezione di NO in questi pazienti.^{83,158}

Inoltre le concentrazioni più alte di dimetilarginina riportate nell'escreato, possono essere influenzate da diversi fattori. Gli stessi autori del lavoro sull'escreato mostrano i limiti della metodica, in considerazione del fatto che l'escreato in FC è ricco in proteine, ed il turnover delle proteine potrebbe influenzare i livelli di dimetilarginina; inoltre molti costituenti dell'escreato possono influenzare i livelli di ADMA e la produzione di NO, facendo di EBC ed escreato due matrici scarsamente confrontabili. La popolazione studiata da Grasemann inoltre presenta caratteristiche diverse dalla nostra, in particolare la funzionalità respiratoria nel nostro studio è maggiore; questo può aver influenzato le misurazioni e rende le due popolazioni non confrontabili.

Un altro fattore da considerare studiando i livelli di ADMA nelle vie aeree, è il metabolismo cui va incontro in tale sede.

Ricordiamo che ADMA origina dalla proteolisi dei derivati arginici metilati da parte delle PRMT e viene metabolizzata da DDAH a formare Cit e dimetilamina.¹⁵⁹

È da sottolineare a questo punto il riscontro di più elevato Cit/Tyr e Cit/ADMA nei pazienti FC rispetto ai controlli. Un aumento dell'attività di DDAH nelle vie aeree dei pazienti FC potrebbe spiegare questi dati. Cit è anche un prodotto dell'attività di NOS, che metabolizza Arg a NO e Cit, ma non è possibile stimare in questa sede quanto di esso sia stato generato dall'attività di DDAH o da quella di NOS.

L'attività di DDAH nell'escreato FC è stata dimostrata ridursi dopo trattamento antibiotico, come ad indicare un livello maggiore nella malattia esacerbata, ma non è stata condotta una comparazione con i controlli sani o i pazienti stabili, nello studio citato.⁹⁴

I dati precedentemente pubblicati dal nostro gruppo hanno mostrato simili livelli di Cit nell'EBC di pazienti asmatici e controlli sani; in quello studio però i pazienti asmatici avevano ADMA/Tyr più alto nell'EBC, a differenza di quanto trovato in FC, suggerendo una peculiarità nell'infiammazione FC correlata delle vie aeree.¹⁵¹

Se gli elevati livelli di Cit correlassero con un disregolato metabolismo di ADMA, il ruolo di Cit come outcome andrebbe sicuramente approfondito.

Il rapporto Arg/ADMA è stato scelto come miglior indicatore della disponibilità di L-Arg e della disfunzione di NOS.^{102,160} Arg/ADMA è risultato leggermente, pur se non significativamente ridotto nell'EBC dei pazienti con FC stabili rispetto ai controlli sani, mentre risulta significativamente ridotto nei pazienti esacerbati, dopo trattamento antibiotico. Anche il rapporto H-Arg/Tyr è minore nei pazienti FC; questo potrebbe derivare dall'aumentata attività di arginasi nelle vie aeree in FC, come già dimostrato.¹⁰⁸

Nei lavori precedenti sull'escreato, l'arginasi appariva ridotta dopo il trattamento antibiotico; qui non abbiamo evidenziato differenza di Arg tra prima e dopo antibiotico, ma ancora una volta, questo può trovare spiegazione nelle differenze intrinseche tra EBC ed escreato, e dalla complessità dei meccanismi coinvolti nel metabolismo di Arg.

L'arginasi e NOS competono per il metabolismo dell'arginina e la loro disregolazione ha un ruolo nell'infiammazione delle vie aeree e nella disfunzione di NOS sia in asma che in FC.^{94,109,160-163}

Per quanto riguarda le indagini sul plasma, è emerso come certi metaboliti siano più elevati in FC; in particolare Arg, Tyr, NMMA sono risultati maggiori sia nei pazienti stabili che negli esacerbati; ADMA, Cit ed H-Arg sono risultati maggiori solo negli esacerbati.

All'interno della popolazione FC, è emerso come ADMA sia maggiore negli esacerbati prima del trattamento che negli stabili. Dopo il trattamento questa differenza non sussiste più e si riduce anche il rapporto SDMA/ADMA. Negli esacerbati dopo il trattamento Arg risulta aumentato. Non si sono

evidenziate correlazioni con la funzionalità respiratoria e le correlazioni con PCR non sono risultate prevedibili e uniformi tra i diversi gruppi.

Sicuramente degno di nota il riscontro di elevati livelli di ADMA nei pazienti con esacerbazione, in contrasto con il dato sull'EBC. Nel lavoro sui pazienti asmatici,¹⁰⁵ i livelli sierici e nell'EBC di ADMA non hanno mostrato correlazione, come ad indicare una localizzazione dell'infiammazione a livello polmonare, e un'eccessiva influenza sui livelli sierici da parte di altre componenti sistemiche, rispetto a quella respiratoria. Nei nostri dati in FC invece questa discrepanza sembra far intuire come i processi delle vie aeree siano diversi e influenzati da molteplici fattori e variabili, come verrà discusso oltre.

Un altro dato su cui soffermarsi è il rialzo di Arg in FC rispetto alla popolazione sana, e all'aumento in seguito alla terapia antibiotica, negli esacerbati. I dati ottenuti sulla popolazione sana, sono coerenti con gli intervalli di riferimento per le concentrazioni pubblicati in letteratura.¹⁶⁴

È noto come L-Arg sia un aminoacido semiessenziale, ritrovato nella maggior parte dei cibi, ma possa essere anche sintetizzato a partire da Cit. Essa è substrato essenziale per la sintesi proteica e per la sintesi di NO; il bilancio tra il livello intracellulare di L-Arg, cui consegue la produzione di NO, ed extracellulare è legato all'attività del trasportatore per gli aminoacidi cationici (CAT). Ridotte quantità plasmatiche sono descritte nell'ipercolesterolemia. La maggior parte di L-Arg derivata dall'apporto dietetico viene metabolizzata dal fegato ed utilizzata nel ciclo dell'urea epatico. La concentrazione plasmatica di L-Arg può essere ridotta parallelamente alla riduzione di GFR e può aumentare con l'aumento della glicemia.¹⁶⁴

Un recente studio sui livelli di L-Arg e arginasi plasmatici è stato condotto in una piccola popolazione di pazienti FC. L-Arg plasmatica è risultata ridotta nei pazienti esacerbati, aumentando in seguito a terapia antibiotica. La disponibilità di L-Arg, espressa come L-Arg/Ornitina, è risultata ridotta in FC, anche in seguito a trattamento. Le concentrazioni di arginasi, aumentate in corso di esacerbazione, rientravano nei range di normalità dopo trattamento.¹⁰⁷

I nostri dati rispecchiano questo aumento dei livelli di Arg dopo trattamento.

Il dato dell'aumentata Arg rispetto ai sani merita una riflessione. Finora i dati in letteratura deponevano per una assenza di differenza tra FC e sani. Su un campione di 11 pazienti FC, i livelli di L-Arg plasmatici non sono risultati diversi da quelli dei controlli sani; in questo gruppo, la somministrazione di una singola dose di L-Arg portava ad aumento delle concentrazioni plasmatiche e in escreato di L-Arg.¹⁶⁵

Simili livelli nel plasma di L-Arg in FC e controlli sani sono stati confermati anche più recentemente; in questo studio inoltre i pazienti FC hanno mostrato maggior clearance di Arg e

maggior conversione de novo da Cit a Arg. Bassi livelli di Arg sono stati riscontrati nel sottogruppo con insufficienza nutrizionale.

La relazione tra L-Arg ed arginasi è sicuramente complessa; la somministrazione sistemica di L-Arg ha condotto ad aumento dell'attività di arginasi con produzione di ornitina nei pazienti con anemia falciforme.¹⁶⁶

I pazienti non risultano supplementare Arg nella dieta, che appare varia. Riflettendo su uno studio pilota, in cui una supplementazione orale di L-Arg ad una dose di 150 mg/Kg/dì è risultata in un aumento dei livelli plasmatici di L-Arg in FC,¹⁶⁷ appare difficile pensare che ci possano essere tali discrepanze tra la dieta dei pazienti arruolati e quella dei sani. Rimane comunque un limite della nostra metodica non aver conteggiato l'intake proteico. Ulteriore limite è non aver dosato l'ornitina, che, in quanto prodotto finale dell'arginasi, avrebbe consentito di avere una misura di disponibilità di L-Arg più adeguata.

Data la necessità di interventi terapeutici tempestivi in FC, c'è stata un'abbondante ricerca sui biomarkers presenti in varie matrici, ma al momento nessun biomarker ha mostrato di predire l'efficacia clinica di un trattamento, la necessità di un trattamento e la correlazione coi dati clinici. Tra le matrici biologiche, sicuramente EBC è un'opzione emergente e promettente.^{139,144,147}

Nel nostro studio, la raccolta di EBC si è dimostrata fattibile e ripetibile, richiedendo minima collaborazione. Il limite principale della metodica rimane la diluizione del campione; per cui abbiamo utilizzato la Tyr come fattore di aggiustamento della diluizione, riportando i valori rapportati alla tirosina.¹⁰⁵

Un limite intrinseco, infine, quando si valutano i markers infiammatori in FC, è legato alla grande complessità di meccanismi infiammatori. ADMA e i suoi metaboliti sono risultati presenti in tutti i campioni FC, ma il loro potenziale ruolo quale marker risulta ancora non chiaro. I livelli dei metaboliti possono essere influenzati dall'uso conico di trattamenti farmacologici, o dalla presenza del vasto spettro di patogeni nelle vie aeree in FC. La scelta che ha guidato il nostro studio, di arruolare pazienti pediatriche con funzionalità respiratoria conservata, in assenza di fattori sicuramente confondenti quali malattia severa, infezione da germi multi resistenti come B. cepacia, ha mirato a minimizzare questa alta variabilità di malattia in FC. I componenti dell'esalato possono tuttavia riflettere anche le differenze e la varietà di condizioni tra pazienti, anche a questo precoce stadio di malattia respiratoria. Il plasma è apparso meno influenzato da questa variabilità.

In conclusione, questo è il primo lavoro sulla misurazione simultanea nell'EBC e nel plasma in FC di ADMA e dei metaboliti correlati. Un disregolazione nel metabolismo delle arginine e nella clearance di ADMA nelle vie aeree possono essere suggeriti dagli alti livelli di Cit/Tyr riscontrati in EBC in presenza di normali ADMA/Tyr, in confronto alla popolazione sana. Un aumento del livello

di ADMA nel plasma consente di discriminare tra soggetti stabili ed esacerbati; inoltre l'effetto della terapia antibiotica comporta l'annullamento di questa differenza ed un aumento dei livelli di Arg. Il quadro relativo alle vie aeree appare dunque diverso dalla situazione nel plasma, probabilmente per la peculiarità che caratterizza le vie aeree in FC.

In futuro, a completamento di quanto ottenuto, un'indagine sull'attività di DDAH nelle vie aeree e la determinazione dei prodotti dell'arginasi nel plasma potrebbero fornire nuove informazioni; inoltre, un'estensione della ricerca alle urine potrebbe essere considerata per valutare l'escrezione di ADMA.

In merito al completamento del quadro metabolico, in considerazione dell'alta variabilità fenotipica in FC, uno studio a carattere metabolomico potrebbe consentire analisi più complete. Nel campo respiratorio, già applicata all'EBC nell'asma,^{168,169} la metabolomica è stata utilizzata in FC sul BAL, distinguendo tra alto e basso grado di infiammazione, su colture dell'epitelio delle vie aeree, evidenziando diversi profili tra soggetti FC e non FC¹⁷⁰ e sull'EBC, dove ha evidenziato dei metaboliti associati alla malattia e allo stadio di instabilità^{169,171}, alla infezione da P.A.¹⁷²

La definizione di profili metabolici correlati allo sviluppo di infezione, colonizzazione da P.A. e peggioramento clinico potrebbe aiutare a stratificare i pazienti, e a definire l'influenza delle diverse caratteristiche ambientali sulla malattia.

7. L'INFIAMMAZIONE E L'INFEZIONE INDAGATE ATTRAVERSO LA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE: LA SEQUENZA DWI

7.1 Background

Le esacerbazioni respiratorie segnano la storia naturale dell'individuo affetto da FC. Esse sono caratterizzate da uno stato infiammatorio ed infettivo che progressivamente conduce a danno polmonare, come descritto nei capitoli 2 e 3.¹⁷³

Esse sono identificabili tramite un peggioramento clinico, funzionale e cambiamenti radiologici.

Il management clinico nella patologia polmonare FC è mirato al controllo delle riacutizzazioni polmonari, allo scopo di ridurre l'infiammazione e l'infezione e ritardare il danno irreversibile delle vie aeree. Come descritto nel capitolo 1, un miglioramento prognostico è descritto in FC negli ultimi decenni, legato all'introduzione di nuovi trattamenti, ma anche al miglior e più intensivo follow-up clinico e radiologico. Per impostare un adeguato trattamento e valutarne l'efficacia, è importante localizzare e monitorare l'infiammazione. In questo senso l'esame obiettivo, gli esami biochimici e le prove di funzionalità respiratoria sono limitati per la loro natura sistemica, e lo scarso richiamo alla regionalità dell'infiammazione.¹⁷⁴ L'utilizzo dell'imaging radiologico è pertanto routinario. L'RX torace, per il suo basso costo e ampia disponibilità, è sicuramente la tecnica più utilizzata, ma viene limitato dalla capacità di discriminare principalmente solo le alterazioni più grossolane.¹⁷⁵

La tomografia computerizzata (TC) consente un'adeguata localizzazione e precisa quantificazione dei cambiamenti polmonari anche precoci;¹⁷⁶ è pertanto usata nel monitoraggio delle alterazioni strutturali, ma non si presta ad un monitoraggio a breve termine, a causa dell'esposizione al danno radiante, soprattutto nei bambini.¹⁷⁷

Altre tecniche strumentali impiegate nel monitoraggio dei cambiamenti infiammatori in FC sono la PET-TC¹⁷⁸ gravata dall'esposizione alle radiazioni e limitata dai costi e dalla scarsa disponibilità, il LCI che consente un'informazione quantitativa sull'infiammazione precoce ma non fornisce informazioni sulla localizzazione.¹⁷⁹

La TC consente la visualizzazione precoce di alterazioni quali le bronchiectasie, ovvero dilatazioni patologiche delle vie aeree, il mucus plug, l'air trapping, dovuto all'iperinsufflazione con intrappolamento aereo, l'ispessimento della parete bronchiale, spesso indicato come segno di infiammazione delle vie aeree.

Sono stati sviluppati diversi score per standardizzare la valutazione qualitativa e quantitativa delle alterazioni morfologiche riscontrate nelle immagini TC. Il più comunemente utilizzato è il Brody

Score II, la cui versione standardizzata è definita CFCT score. Essa prevede il riconoscimento e la valutazione della gravità dei seguenti reperti:

1. Bronchiectasie
2. Tappi di muco
3. Ispessimento della parete bronchiale
4. Alterazioni parenchimali (ground-glass, bolle/cisti, consolidazioni)
5. Air trapping.

Il punteggio trova dei limiti nella variabilità interosservatore che tende ad aumentare negli stadi precoci di malattia polmonare.¹⁸⁰

Con l'aumentare della vita media dei pazienti affetti da fibrosi cistica, l'esposizione a radiazioni assume maggiore importanza; infatti, rischia di innalzarsi anche il rapporto rischio/beneficio, con particolare riferimento alla dose cumulata effettiva per ciascun paziente.

Studi recenti dimostrano che con il protocollo attuale, raccomandato da de Jong e colleghi che consiste in un esame TC a bassa dose ogni due anni, la dose cumulativa può giungere a 25-50 mSv;¹⁸¹ a questo dato vanno aggiunte le indagini radiologiche svolte nelle riesacerbazioni di malattia, e quelle di altri distretti corporei, stimando la dose cumulata in circa 1.67 mSv/anno.¹⁸²

Il rischio individuale di sviluppare un tumore solido da esposizione a radiazioni ionizzanti in seguito a tale follow-up è stato stimato a circa il 6%.¹⁸³

La RMN polmonare

Lo sviluppo di una tecnica affidabile, priva di radiazioni, che dia un'informazione quantitativa e una localizzazione dei cambiamenti infiammatori polmonari in FC appare fondamentale.

La Risonanza magnetica (RMN), tecnica priva di radiazioni ionizzanti, si presta ad un utilizzo nel monitoraggio a breve termine.

In ambito polmonare, la RMN è sempre stata limitata da difficoltà intrinseche legate alla tecnica di RMN e alle caratteristiche del tessuto polmonare, in particolare la bassa densità protonica, le numerose interfacce aria-tessuto, i tempi di rilassamento molto brevi che richiedono sequenze rapide e il movimento continuo con i conseguenti artefatti.

Innovazioni tecniche hanno consentito negli ultimi anni di superare queste difficoltà, in particolare tramite sincronizzazione dell'acquisizione del segnale RMN con i movimenti respiratori e cardiaci.¹⁸⁴

Le comuni sequenze RMN per uno studio morfologico, consentono di visualizzare tutte le alterazioni tipiche della FC: bronchiectasie, ispessimento bronchiale, livelli idro-aerei, consolidazioni e distruzioni segmentali/lobari.^{185,186}

Il limite principale è la risoluzione spaziale della RM, generalmente di 1.5 x 1.5 x 5.0 mm, che permette di riconoscere i bronchi periferici solo fino alla terza o quarta generazione, a differenza della TC la cui risoluzione spaziale arriva alla caratterizzazione dei bronchi di ottava generazione.

La possibilità di utilizzare le sequenze T1 o T2 e l'assunzione del mezzo di contrasto con gadolinio implementa però le possibilità diagnostiche della metodica rispetto alla TC. Nelle sequenze T2, l'edema verosimilmente causato da infiammazione attiva può dare un segnale molto elevato dal bronco; nelle T1 con utilizzo di gadolinio, l'infiammazione può essere descritta come aumento del segnale delle pareti bronchiali. La RMN consente inoltre una pronta distinzione del tappo di muco dalle pareti bronchiali ispessite grazie all'elevato segnale T2 dei fluidi contenuti all'interno del muco.

Analogamente alla TC, la RMN è in grado di visualizzare il broncogramma aereo come area a basso segnale che segue il decorso dei bronchi all'interno della zona consolidata.

È stato recentemente sviluppato un sistema di punteggio basato sull'imaging RMN.¹⁸⁷

Un ulteriore vantaggio della RMN è la possibilità di ottenere informazioni relative alla funzione polmonare come la perfusione, l'emodinamica polmonare e la ventilazione utilizzando mezzo di contrasto o l'inalazione di gas nobili iper polarizzati come l'elio, tecniche, queste, utilizzate finora solo in campo di ricerca.

Una tecnica RMN particolare, definita DWI (diffusion weighted imaging) ha promettenti risvolti sull'ambito polmonare e in particolare sull'infiammazione.

Essa studia la diffusione molecolare dell'acqua libera nell'organismo. Questa segue il movimento casuale di microscopici spostamenti di molecole causato dalla dissipazione dell'energia termica in energia cinetica secondo il moto Browniano.¹⁸⁸

Nell'utilizzo clinico è stato osservato come la diffusione delle molecole d'acqua sia inversamente proporzionale alla cellularità, all'integrità delle membrane cellulari e alla lipofilia del tessuto. La diffusione è ristretta o impedita in tessuti con alta cellularità, per esempio tumori, ascessi, fibrosi ed edema citotossico.¹⁸⁹

Essa è stata impiegata in ambito neurologico, per la sua sensibilità all'insulto ischemico, e in pneumologia per l'indagine sulle lesioni neoplastiche. La sua correlazione all'infiammazione ne ha fatto una promettente tecnica.¹⁸⁹

Recentemente la DWI è stata anche utilizzata nello studio di patologie infiammatorie croniche, evidenziando la sua capacità di discriminare il tessuto sede di lesioni infiammatorie dal tessuto normale. In tal senso interessante è il recente utilizzo nello studio delle lesioni infiammatorie ileali nel morbo di Crohn, difficilmente diagnosticabili con altre metodiche.¹⁹⁰

Fattibilità dello studio

Un lavoro recente sul confronto TC e RMN, svolto presso il Centro FC di Treviso, in collaborazione con la Radiologia di Treviso e l'Erasmus MC di Rotterdam ha dimostrato buona concordanza inter- ed intra- osservatore nella lettura della RMN toracica.¹⁹¹

In questo lavoro la sensibilità della RMN sul piano morfologico non riesce ad eguagliare quella della TC. Considerando però i buoni dati di lettura e la possibilità di utilizzare la sequenza DWI, è stato condotto dallo stesso gruppo uno studio pilota sui pazienti FC stabili, in cui si è osservato che DWI riusciva a riconoscere hot-spots solo parzialmente sovrapponibili alle anomalie strutturali sulle TC e RMN morfologiche. Inoltre DWI mostrava correlazione con gli indicatori clinici di gravità di malattia (osservazioni non pubblicate).

7.2 Scopo

Abbiamo pertanto disegnato uno studio, presso la UOC di Radiologia e l'UOS di Fibrosi cistica di Treviso per valutare la capacità di DWI di discriminare un'esacerbazione polmonare e di valutare la risposta al trattamento antibiotico e la correlazione con i dati morfologici.

7.3 Materiali e metodi

Popolazione in studio

Cinquantotto pazienti con FC sono stati arruolati tra i pazienti seguiti presso l'UOS FC di Treviso e tra i ricoverati in UOC Pediatria di Treviso. Il consenso informato è stato ottenuto in forma scritta dal paziente o dai genitori per i pazienti minori prima della partecipazione del paziente allo studio.

Sono stati applicati i seguenti criteri di inclusione ed esclusione.

Criteri di inclusione:

- Diagnosi confermata di FC mediante test genetici o positività al test del sudore
- Abilità nell'eseguire test spirometrici riproducibili
- FEV1 pari o maggiore al 40% del predetto
- Abilità al sottoporsi a manovre di indagine RM
- Età maggiore o uguale ad anni otto

Criteri di esclusione:

- Pazienti sottoposti a ossigeno-terapia cronica
- Colonizzazione da B. Cepacia delle vie aeree
- Pazienti sottoposti a trapianto polmonare
- Partecipazione contemporanea ad altre sperimentazioni cliniche
- Qualsiasi controindicazione all'esecuzione delle indagini RM
- Stato di gravidanza

- Inabilità o non volontà a dare il consenso
- Pazienti con diagnosi di ABPA

L'arruolamento è stato proposto ai pazienti affetti da esacerbazione respiratoria al momento della diagnosi di quest'ultima prima, o entro 24 ore dall'avvio della terapia antibiotica. Inoltre sono stati arruolati anche pazienti in assenza di esacerbazione, con malattia polmonare stabile, alle visite di routine, e matchati per età e per sesso.

La diagnosi di esacerbazione polmonare è stata posta tramite un sistema di punteggio basato sui seguenti criteri:

- Diminuita tolleranza all'esercizio fisico
- Aumento della tosse
- Aumento dell'escreato
- Paziente costretto ad assentarsi dal lavoro o da scuola
- Aumento dei reperti auscultatori all'esame obiettivo
- Diminuzione dell'appetito
- Diminuzione del FEV1 (>10% del predetto)

Alla presenza/assenza di ciascuno di questi parametri è attribuito un coefficiente. La somma dei coefficienti forma il punteggio finale. Secondo tale sistema, il punteggio è considerato compatibile con esacerbazione se lo score finale è maggiore o uguale a 2.5, oppure con malattia stabile se lo score risulta inferiore a 2.5.¹⁹²

Disegno dello studio

Si tratta di uno studio longitudinale svolto in un singolo centro, per il quale è stata emessa approvazione da parte del Comitato Etico Provinciale di Treviso.

Dopo acquisizione del Consenso informato, i pazienti venivano sottoposti al protocollo di studio, come da Tabella 14.

	Arruolamento	T1	T2
Consenso informato	X		
Verifica criteri di inclusione/esclusione	X		
Verifica punteggio di esacerbazione	X		
Anamnesi	X		
Esame clinico		X	X
Spirometria		X	X
RMN torace		X	X

Tabella 14. Disegno dello studio.

Il protocollo prevedeva di sottoporre tutti i pazienti a visita, spirometria e RMN toracica (T1). I pazienti con esacerbazione venivano sottoposti a trattamento antibiotico come da routine clinica e ripetevano gli stessi accertamenti alla fine della terapia antibiotica. Allo stesso modo i soggetti stabili ripetevano gli stessi accertamenti dopo un sovrapponibile lasso di tempo (T2).

Esame clinico e funzionalità respiratoria

L'esaminazione clinica consisteva nell'esame obiettivo, misurazione di HR e SpO₂, misure auxometriche.

La spirometria è eseguita con Jaeger-Carefusion® (Hoechberg, Germany) Masterscope secondo le linee guida ATS/ERS.¹⁵⁴ Almeno tre manovre forzate sono state completate per ogni test e la miglior FVC, i migliori flusso espiratorio (MMEF) e FEV₁ sono state considerate per l'analisi dei dati.

Protocollo per RMN torace

La RMN a 1.5 T (Avanto, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) è stata eseguita utilizzando sequenze morfologiche e funzionali. Le sequenze morfologiche includevano BLADE assiale e coronale con trigger respiratorio, pesate in T2 e proton density, e TRUFISP assiali e coronali con respiro trattenuto.¹⁹¹

Le sequenze funzionali includono un'acquisizione echo planar imaging di DWI assiale con trigger respiratorio con multipli valori di b a differenti intervalli temporali (b = 0, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 150, 200, 400, 800 s/mm²).

L'analisi delle immagini è stata condotta con il software SYNAPSE (Fujifilm Healthcare Europe, Dusseldorf, Germany)

Le immagini sono state rese anonime e valutate in ordine casuale da due radiologi esperti; entrambi i radiologi erano in cieco rispetto ad ogni informazione clinica e alla valutazione dell'altro.

Alle sequenze BLADE e TRUFISP è stato attribuito un punteggio con il sistema CF-MRI già descritto.¹⁹³ Le immagini DWI sono state valutate con un punteggio semiquantitativo utilizzato in lavori precedenti.¹⁹⁴ In particolare per ogni lobo viene determinate: la presenza di hot-spot, l'estensione di hot-spot, l'intensità di segnale del maggiore hot-spot e la media dell'intensità di segnale degli hot-spot. Il punteggio massimo è 54. Il punteggio è stato attribuito nelle sequenze DWI con il più alto b-value (b= 800mm/sec²).

Le immagini DWI sono state inoltre studiate quantitativamente utilizzando le mappe di Coefficiente di diffusione apparente (ADC). Nella piattaforma SYNAPSE, tramite uno strumento di traccia a mano libera, una regione di interesse (ROI) è stata posizionata nell'hot-spot polmonare più grande

nelle mappe ADC. Una ROI di dimensione simile è stata posizionata nella stessa localizzazione polmonare sulle mappe ADC nelle due RMN (T1 e T2).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta con SPSS (versione 20.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

Nella comparazione tra i gruppi sono stati utilizzati il T-test per dati non appaiati e il Mann-U-Whitney test. Per confrontare le differenze tra il primo e il secondo time-points sono stati usati il T-test per dati appaiati e il test di Wilcoxon.

La concordanza inter- ed intra- osservatore sono state indagate con il coefficiente di correlazione intraclasse (ICC) e i Bland-Altman plots.

La correlazione di Pearson è stata impiegata per misurare le associazioni tra clinica, DWI, punteggio CF-MRI e prove di funzionalità respiratoria.

Le differenze sono considerate significative per p-value < 0.05.

7.4 Risultati

Popolazione studiata

Sono stati arruolati 58 pazienti, di cui 27 con malattia polmonare stabile, e 31 con esacerbazione respiratoria. Le caratteristiche all'arruolamento dei pazienti sono mostrate in tabella 15. Le due popolazioni sono risultate uniformi per sesso, età e microbiologia. La funzionalità respiratoria intesa come FEV₁ e FVC medi dei 6 mesi precedenti l'arruolamento, è risultata più compromessa nei pazienti con esacerbazione.

Caratteristiche	Tutti i pazienti	Malattia stabile	Esacerbazione	p-value stabili VS esacerbati
Soggetti (n)	58	27	31	
Età media (SD)	24.54 (10.79)	24.12 (11.65)	24.90 (10.17)	Ns
% femmine	60.34	51.65	67.74	Ns
% colonizzazione da P.A.	41.38	37.07	45.16	Ns
% colonizzazione da MRSA	12.07	11.11	12.9	Ns
FEV₁ % pred medio dei 6 mesi precedenti (SD)	80.13 (20.36)	89.12 (19.49)	72.05 (17.81)	0.011
FVC % pred medio degli ultimo 6 mesi (SD)	91.21 (15.60)	97.31 (14.21)	85.72 (14.94)	0.04

Tabella 15. Caratteristiche della popolazione arruolata.

Confronto tra stabili ed esacerbati

Al primo timepoint T1, si è evidenziata una differenza significativa tra stabili ed esacerbati, sia nel punteggio clinico, sia per i parametri spirometrici, sia per gli score radiologici. In particolare, il gruppo degli stabili presentava un punteggio morfologico CFMRI e funzionale DWI inferiore ai pazienti esacerbati, come mostrato in Tabella 16.

Parametri	Stabili	Esacerbati	p-value
FEV ₁ % pred	88.2 (17.6)	70.7 (19.5)	0.001
FVC % pred	98.6 (13.3)	81.9(21.8)	0.01
MMEF % pred	68.8 (31.8)	44.2 (23.8)	0.002
PEX	0	4.5 (4.1-5.9)	<0.001
CFMRI	16.2 (11-36)	42 (25-61)	<0.001
DWI	7 (0-16.7)	22 (9-26)	0.002
ADC	1.55 (1.49-1.64)	1.26 (1.21-1.46)	<0.001

Tabella 16. Confronto tra pazienti stabili ed esacerbati al T1.

Al secondo timepoint T2, come mostrato in Tabella 17, il gruppo degli stabili ha presentato ancora funzionalità respiratoria migliore e punteggio CFMRI minore. Non si sono però più rese evidenti differenze a livello del punteggio clinico PEX e del punteggio DWI e ADC.

Parametri	Stabili	Esacerbati	p-value
FEV ₁ % pred	88.3 (18.9)	77.3 (19.5)	0.036
FVC % pred	96.7 (14.2)	86.9 (15.6)	0.016
FEF % pred	68.6 (33.4)	52.6 (27.9)	0.053
PEX	0	1.2 (0-1.2)	0.1
CFMRI	16 (1-34.5)	39 (18-56)	0.002
DWI	9 (0-17.7)	13 (5-19)	0.179
ADC	1.56 (1.48-1.61)	1.57 (1.35-1.63)	0.9

Tabella 17. Confronto tra pazienti stabili ed esacerbati al T2.

Confronto tra T1 e T2

Il gruppo dei pazienti stabili non ha presentato differenze significative tra primo e secondo timepoint, né a livello di punteggio clinico, né come prove di funzione respiratoria, né a livello di punteggio CFMRI e DWI.

Il gruppo degli esacerbati invece, come mostrato in Figura 15, ha presentato miglioramento del punteggio clinico, delle prove di funzionalità respiratoria, del punteggio CFMRI e DWI e del valore ADC (tutti $p < 0.0001$).

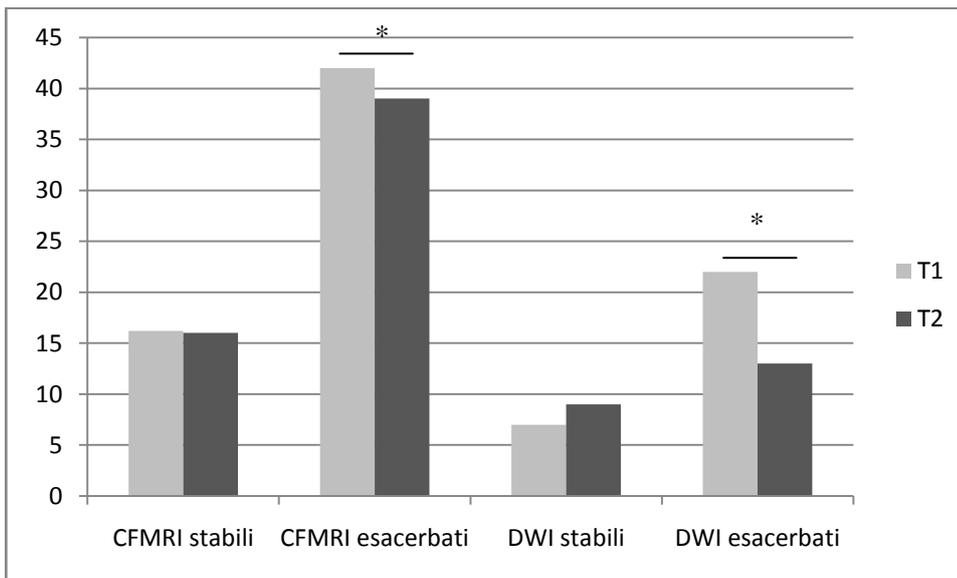


Figura 15. Confronto dei punteggi radiologici tra T1 e T2 nei due gruppi di pazienti.

Correlazioni

Il punteggio DWI ha mostrato forte correlazione inversa con il FEV₁ e il MMEF sia al primo che al secondo timepoint. Ha inoltre mostrato forte correlazione positiva con il punteggio clinico PEX al primo timepoint e solo debole correlazione al secondo timepoint. ADC ha mostrato forte correlazione negativa con il punteggio clinico PEX alla prima RMN ($r=-0.634$, $p<0.0001$), ma non alla seconda RMN ($r=-0.43$, $p=0.766$). Si è studiata la correlazione tra i punteggi RMN: il punteggio DWI correla positivamente con CFMRI ad entrambi i timepoint. Si veda tabella 18.

	CFMRI T1	FEV1 T1	MMEF T1	PEX T1	CFMRI T2	FEV1 T2	MMEF T2	PEX T2
DWI T1	$r=0.809$ $p<0.0001$	$r=-0.635$ $p<0.0001$	$r=-0.611$ $p<0.0001$	$r= 0.504$ $p<0.0001$	-	-	-	-
DWI T2	-	-	-	-	$r=0.767$ $p<0.0001$	$r=-0.633$ $p<0.0001$	$r=-0.626$ $p<0.0001$	$r=0.364$ $p=0.005$

Tabella 18. Coefficiente di correlazione di Spearman e sua significatività.

Inoltre è stata testata la correlazione tra CFMRI al T1 e funzionalità respiratoria nei 6 mesi precedenti, con correlazione negativa e rispettivamente per FEV1 medio $r= -0.654$, $p<0.0001$ (vedi Figura 16), per FVC medio $r= -0.581$, $p<0.0001$.

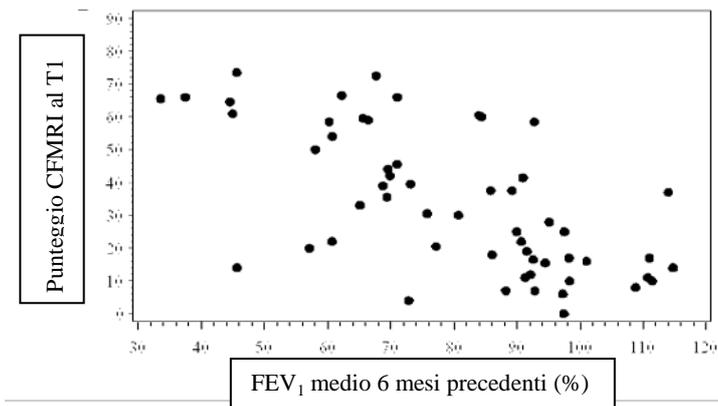


Figura 16. Correlazione tra punteggio morfologico CFMRI e FEV₁ medio nei 6 mesi precedenti l'arruolamento in tutti i pazienti FC.

Affidabilità del punteggio DWI

La concordanza inter-osservatore ad entrambi i timepoints è risultata molto buona (ICC T1=0.904; ICC T2=0.877); anche la concordanza intra-osservatore è risultata molto buona (ICC T1=0.939; ICC T2=0.9) ad entrambi i time-points.

In figura 17 e 18 sono mostrati questi dati graficamente tramite plot Bland-Altman.

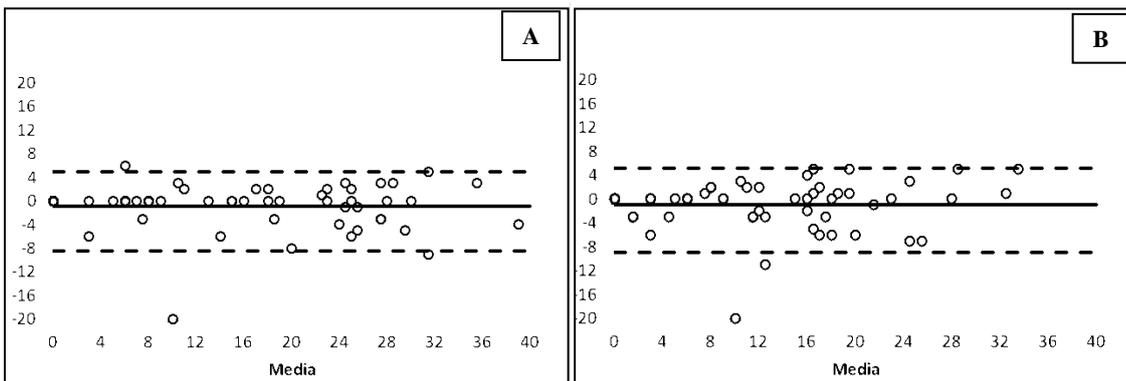


Figura 17. Concordanza intra-osservatore al T1 (A) e al T2 (B).

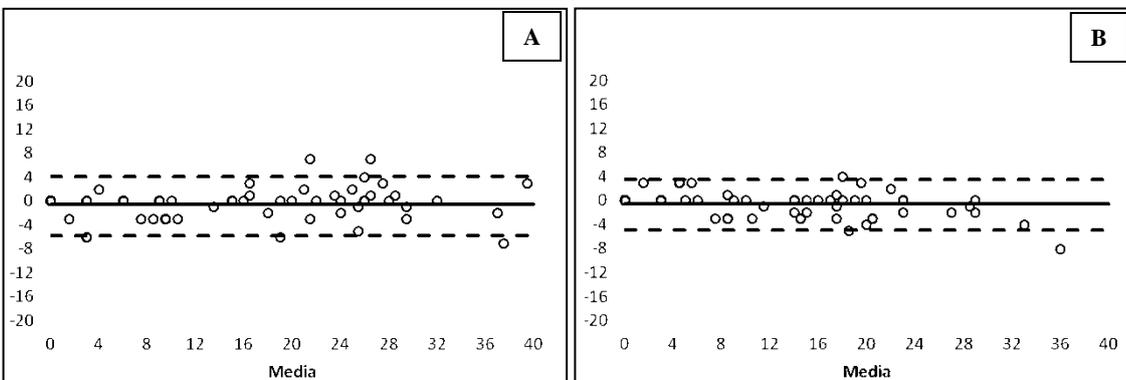


Figura 18. Concordanza inter-osservatore al T1 (A) e al T2 (B).

Colonizzazione delle vie aeree e punteggio morfologico

Abbiamo indagato se lo score CFMRI fosse influenzato dalla colonizzazione delle vie aeree confrontando i dati dei pazienti privi di colonizzazione da P.A. (n=34) con quelli dei pazienti colonizzati (n=23). Lo score morfologico è risultato peggiore nel gruppo con P.A. rispetto al gruppo non colonizzato (44.26 DS 21.75 vs 25.93 DS 17.77; p=0.002). Il FEV₁ medio nei 6 mesi precedenti era minore nel gruppo con P.A. (p= 0.017) rispetto ai pazienti non colonizzati.

7.5 Discussione

La RMN toracica è una tecnica emergente nell'ambito della patologia polmonare da FC. L'utilizzo della sequenza DWI è innovativo in quest'ambito.

La tecnica è risultata attuabile e ne abbiamo mostrato un'eccellente concordanza intra- ed inter-osservatore, per quanto riguarda sia il punteggio basato sulle sequenze morfologiche sia quello di DWI.

Abbiamo mostrato che il punteggio DWI e ADC sono in grado di discriminare un'esacerbazione respiratoria, come definita dal punteggio PEX e dalle prove di funzionalità respiratoria. Essi hanno inoltre mostrato capacità di individuare i cambiamenti successivi alla terapia antibiotica.

È possibile pensare ad un ruolo di DWI come biomarker in corso di esacerbazione per valutare la necessità e l'efficacia della terapia. Infatti come mostrato dallo studio, il segnale DWI nei pazienti con esacerbazione mostra una significativa riduzione dopo terapia antibiotica; nei pazienti stabili invece questo cambiamento non si verifica.

Mentre le differenze nella DWI tra stabili ed esacerbati al primo timepoint non si confermano al secondo timepoint, questo non è vero per CFMRI. Il punteggio CFMRI è infatti significativamente diverso tra i due gruppi ad entrambi i timepoint. Questo potrebbe trovare spiegazione in una peggiore condizione di base del gruppo esacerbato, come ipotizzabile anche dalla peggior funzionalità respiratoria nei sei mesi precedenti. Inoltre bisogna ricordare che tra le componenti del punteggio CFMRI esiste anche il mucus plugging, condizione suscettibile al trattamento antibiotico. Il punteggio ADC, invece, è risultato significativamente diverso tra i due gruppi solo al primo timepoint, come ad esprimere la capacità di discriminare un cambiamento acuto.

Sia il punteggio DWI che ADC hanno mostrato significativa correlazione con lo stato clinico e la funzionalità respiratoria al primo timepoint, con solo debole correlazione al secondo timepoint. CFMRI al secondo timepoint mostra migliore correlazione con i parametri spirometrici rispetto al punteggio DWI, come a significare una migliore descrizione della patologia di base da parte di CFMRI, e un migliore riconoscimento dei fatti acuti da parte di DWI e ADC. Il CFMRI ha mostrato

correlazione negativa con la funzionalità dei sei mesi precedenti, e si è presentato più elevato nei pazienti con colonizzazione da P.A.

In conclusione, per l'assenza di esposizione a radiazioni, la RMN si presta al monitoraggio e alle indagini sull'efficacia di nuove terapie, in ambito di ricerca, ma anche come strumento di follow-up nella gestione routinaria del paziente.

Un limite dello studio è il non avere utilizzato come termine di paragone una tecnica in grado di rilevare l'infiammazione, quale un campionamento in BAL o la PET-TC. Queste tecniche non sono routinariamente impiegate e si è cercato di ovviare a questa criticità tramite il confronto con gli stabili. La RMN polmonare inoltre richiede apparecchiature ad elevata prestazione e una particolare competenza degli Operatori, sia TSRM che Medici Radiologi.

Il metodo inoltre necessita di studi multicentrici su popolazioni più ampie per essere applicato clinicamente.

8. INFEZIONE CRONICA ED EFFETTI SULL'ANTIBIOTICO RESISTENZA

8.1 Background

Come descritto nel capitolo 3, le infezioni esordiscono molto precocemente nella storia dei pazienti con FC, inizialmente come riscontro intermittente, infine come colonizzazione cronica con successivo adattamento batterico alle condizioni dell'ambiente polmonare.

Un aspetto peculiare di questo adattamento riguarda le antibiotico resistenze.

Antibiotico-resistenza e *Pseudomonas aeruginosa*

P.A., tra i diversi batteri riscontrati nelle vie aeree in FC, è quello che si caratterizza per la frequenza di riscontro e l'impatto sulla morbilità e mortalità.

Come noto, esso va incontro a meccanismi di adattamento e modifica dopo l'esordio della colonizzazione cronica. In particolare, in tale fase, risultano selezionati ceppi ipermutabili caratterizzati dall'acquisizione di antibiotico-resistenza, crescita in biofilm, adattamento metabolico e attenuazione della virulenza.^{195,196}

La terapia antibiotica è un caposaldo del trattamento di FC e i pazienti sono esposti a ripetuti cicli antibiotici in lunghi periodi.

In considerazione dell'associazione di P.A. con il declino della funzione respiratoria, intensivi provvedimenti sono intrapresi per tentare di eradicarlo o limitarne la diffusione, come regimi di antibiotici orali, in aerosol o endovenosi.¹⁹⁷

La resistenza antibiotica è una questione emergente nella pratica medica ed una complicazione comune nei pazienti FC infetti da P.A., che si presenta con maggiori resistenze a tutte le classi di antibiotici rispetto ai pazienti non-FC.

Questo sembra riflettere la cronica esposizione ad antibiotici caratteristica del trattamento in FC.¹⁹⁸

L'origine della resistenza deriva da meccanismi sia adattativi che mutazionali. Il principale meccanismo di resistenza intrinseca è la scarsa permeabilità della membrana esterna, a causa del basso numero di canali maggiori costituiti dalla porina OprF e del piccolo calibro dei canali costituiti dalle porine OprD e OprB, che promuove la resistenza ad esempio all'Amikacina.

Un secondo meccanismo di resistenza intrinseca è rappresentato dall'azione di pompe di efflusso, quale la pompa multi-drug Mex, in grado di espellere determinate classi di farmaci antibatterici dalla cellula, utilizzando come fonte di energia l'ATP oppure il gradiente protonico di membrana.

P.A. può inoltre sviluppare un'aumentata resistenza attraverso l'acquisizione di tratti tramite trasferimento orizzontale o resistenza genetica legata allo stato ipermutabile.¹⁹⁹ Tramite il trasferimento orizzontale di sequenze geniche, in forma di plasmidi, trasposoni o profagi, P.A. può

acquisire la capacità di produrre β -lattamasi che conferiscono resistenza alle penicilline ed alle cefalosporine.

Un secondo meccanismo di resistenza acquisita è rappresentato dall'insorgenza di mutazioni spontanee, che possono essere indotte dalla crescita del batterio all'interno del biofilm o dalla presenza di agenti che danneggiano il DNA. Questi meccanismi adattativi conducono ad iperespressione di pompe di efflusso, iperproduzione di β -lattamasi, alterazione del bersaglio molecolare dell'antibiotico, come avviene per la colistina.²⁰⁰

Le popolazioni ipermutabili che emergono nella fase cronica dell'infezione, tramite l'accumulo di mutazioni nel sistema di riparazione del DNA, presentano facilmente alterazioni geniche che promuovono la resistenza ai beta-lattamici tramite l'espressione di AmpC, l'up-regolazione dei sistemi di efflusso Mex o la perdita della porina carbapenemi-specifica OprD.²⁰¹

La resistenza acquisita dipende anche dalla crescita del batterio all'interno del biofilm, che inoltre è responsabile dello sviluppo di tolleranza alla fagocitosi e ai componenti della risposta immunitaria acquisita.¹¹⁷

All'interno del biofilm la distribuzione dell'antibiotico risulta ritardata o incompleta; inoltre negli strati più profondi del biofilm si forma un ambiente anaerobico che conduce all'inattivazione del farmaco. L'ipossia aumenta l'espressione della pompa multi-drug MexEF-OprN, si tratta del principale meccanismo di resistenza verso i Fluorochinoloni.²⁰²

Mutazioni specifiche possono anche condurre all'aumento di espressione di altre pompe di efflusso quale MexXY-OprM, che conduce a resistenza verso Aminoglicosidi, Fluorochinoloni e Cefalosporine.¹⁹⁹

Inoltre la resistenza antibiotica è correlata alla formazione di aggregati associati all'elastasi neutrofila ed alle alterazioni dei processi di quorum sensing che conducono alla formazione del biofilm.¹⁹⁵

Questi meccanismi spesso tendono ad accumularsi nel tempo ed i ceppi diventano gradualmente più resistenti, anche in seguito all'aumentata pressione selettiva esercitata da molteplici cicli di terapia antibiotica.

L'utilizzo di concentrazioni sub-inibenti di antibiotico aumentano la frequenza di mutazioni geniche, favorendo lo sviluppo di nuove forme di resistenza.¹¹¹

Evoluzione delle resistenze antibiotiche di P.A.

Dati sull'epidemiologia di P.A. sono descritti in diverse popolazioni e paesi,²⁰³ mentre i dati sull'evoluzione della suscettibilità antibiotica sono meno esaustivi e in genere fanno riferimento a studi trasversali.

Nel 2000 ad esempio uno studio nazionale inglese ha evidenziato gli alti livelli di resistenza ad agenti di prima linea quali ceftazidime e gentamicina, con eccezione per la colistina.¹³⁴

Negli USA uno studio cross-sectional ha comparato l'antibiotico-resistenza nei pazienti di due coorti (1995 vs 2008) dimostrando nei pazienti più giovani un trend verso l'aumento della resistenza alla tobramicina, ed in quelli adulti un trend verso l'aumento della resistenza alla ciprofloxacina.²⁰⁴

Uno studio multicentrico italiano ha definito la prevalenza dei ceppi multiresistenti nella popolazione FC, evidenziando come Ceftazidime risulti l'antibiotico più efficace nell'eradicazione.²⁰⁵

Tra gli studi longitudinali, uno è stato svolto in Danimarca su campioni del 1973, 1980, 1985 e 1991; è emerso un aumento significativo della Minima Concentrazione Inibente (MIC) per Piperacillina e Ceftazidime e un aumento di fenotipi resistenti in vivo, senza correlazione con il numero di cicli antibiotici.²⁰⁶

Un simile studio, della durata di 2 anni, è stato svolto a Leipzig nel 2003, con l'obiettivo di valutare la graduale evoluzione della resistenza antibiotica in vitro di alcuni isolati di P.A. e la correlazione tra tale evoluzione ed il tipo di terapia antibiotica somministrata; P.A. ha mostrato un precoce sviluppo di resistenza antibiotica, con aumento delle MIC in relazione all'aumento della durata della colonizzazione, soprattutto per Aminoglicosidi e Fluorochinoloni, mantenendo buona risposta ai Carbapenemi.²⁰⁷

Uno studio su una coorte italiana è stato condotto in un periodo di 5 anni tra il 1993 e il 1997, con riscontro di maggiori resistenze nei ceppi mucoidi.²⁰⁸

8.2 Scopo

Lo scopo di questo studio è stato di fornire un'analisi longitudinale della suscettibilità antibiotica di P.A. nei pazienti con FC e colonizzazione cronica da P.A. a 6 antibiotici comunemente usati: Levofloxacina, Ciprofloxacina, Meropenem, Ceftazidime, Amikacina, Colistina.

Si è voluto valutare tale evoluzione nelle fasce d'età evolutiva (< 20 anni) ed adulta, valorizzando le peculiarità nella popolazione di età inferiore ai 20 anni, in particolare l'associazione tra evoluzione delle resistenze antibiotiche e numero di cicli antibiotici all'anno.

8.3 Materiali e metodi

Popolazione in studio

Lo studio ha coinvolto l'intero gruppo di pazienti seguiti presso l'UOS Fibrosi Cistica di Treviso nel 2014. Di questi 156 pazienti sono stati selezionati i pazienti in studio in base ai seguenti criteri di inclusione:

- diagnosi documentata di FC (test del sudore positivo e/o mutazioni genetiche determinate);
- colonizzazione cronica delle vie aeree da parte di P.A. nel periodo compreso tra il 2010 e il 2013, che si definisce con la presenza di almeno tre colture batteriche positive nel corso di 6 mesi, con almeno un mese di intervallo tra le singole colture, in assenza di segni e sintomi di infezione/inflammation;⁶³
- esecuzione di almeno un esame colturale su materiale biologico proveniente dalle vie aeree (escreato o aspirato ipofaringeo) presso l'UOC di Microbiologia dell'Ospedale Ca' Foncello di Treviso;
- ogni età;
- ambo i sessi.

All'interno di questa popolazione di 57 pazienti sono state individuate due sottopopolazioni:

- Pazienti di età inferiore a vent'anni: 13
- Pazienti di età superiore o uguale a vent'anni: 44

Disegno dello studio

Lo studio è stato disegnato come osservazionale retrospettivo che ha coinvolto l'UOS di Fibrosi Cistica di Treviso e l'UOC di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Ca' Foncello di Treviso.

I dati indagati sono stati raccolti ed inseriti prospettivamente in un database clinico ed in un database microbiologico nel periodo compreso tra l' 1/01/2010 e il 31/12/2013. L'estrazione dei dati è avvenuta nel 2014.

Estrazione dei dati dal database clinico

Si tratta di un database elettronico chiamato ISIDE ©. Una tipica cartella clinica raccoglie informazioni relative a dati anagrafici, analisi genetica, test del sudore, funzionalità respiratoria, microbiologia, terapie eseguite e terapie in corso.

Da esso sono stati estratti i dati relativi ai seguenti parametri clinici: età, sesso, auxometria, mutazioni genetiche, tipo di colonizzazione cronica, insufficienza pancreatica esocrina ed endocrina, funzione respiratoria (espressa con il FEV₁ % pred.) e, nei pazienti di età < 20 anni, terapie antibiotiche somministrate per via orale, endovenosa ed aerosolica dal 2010 al 2013.

Le spirometrie sono state eseguite con Jaeger-Carefusion® (Hoechberg, Germany) Masterscope secondo le linee guida ATS/ERS.¹⁵⁴

Estrazione dei dati dal database microbiologico

I dati microbiologici sono stati estratti dall'archivio informatizzato dell'UOS di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Ca' Foncello di Treviso.

Essi sono relativi a tutti gli esami colturali eseguiti tra il 2010 e il 2013 su escreato o aspirato ipofaringeo, con relativo antibiogramma.

I software utilizzati sono stati:

- SWIN (Sensititre Windows), che permette il calcolo delle Minime Concentrazioni Inibenti dopo 12 ore di incubazione del pannello nell'incubatore e lettore automatico SENSITITRE ARIS 2X.
- SWIN Epidemiology, che definisce le Categorie di Interpretazione dell'antibiogramma (sensibile, intermedio, resistente) e l'andamento delle MIC.

Si è scelto di estrarre i dati relativi a sei antibiotici, Amikacina, Ceftazidime, Meropenem, Colistina, Ciprofloxacina e Levofloxacina, poiché sono i più utilizzati presso l'UOS Fibrosi Cistica di Treviso per il trattamento dell'infezione polmonare da P.A.

Metodica di raccolta dei campioni dalle vie aeree per indagini microbiologiche

Sono state considerate due tipologie di campionamento di materiale biologico proveniente dalle vie aeree:

- Escreato, ottenuto da pazienti collaboranti ed in grado di espettorare, al termine di una sessione di drenaggio, a distanza di almeno 8 ore dall'inalazione di terapia antibiotica
- Aspirato ipofaringeo, nei pazienti incapaci di espettorare, o non collaboranti, in tutti i pazienti con scarsità di secrezioni.

I campioni vengono seminati entro due ore dalla raccolta su piastre mirate a isolare selettivamente P.A. costituite da BD Pseudosel Agar (agar ceftrimide) e altri terreni non specifici,²⁰⁹ incubate a 35-38°C fino al mattino successivo.

La lettura dei campioni consiste nel valutare la presenza di crescita e, ove presente, la carica batterica semiquantitativa.

L'identificazione dei patogeni avviene attraverso il sistema VITEK M, un sistema d'identificazione batterica e fungina che utilizza il metodo di spettrometria di massa MALDI (ionizzazione/desorbimento laser assistito da matrice) con analizzatore a tempo di volo. Gli spettri del campione vengono confrontati con il database degli spettri sviluppato da svariate specie batteriche e successivamente interpretati, fornendo i risultati dell'identificazione dell'organismo associati ad un livello di confidenza.

L'Antibiogramma viene prodotto tramite il metodo della microdiluzione in brodo, che fornisce risultati sia qualitativi (sensibile o resistente) sia quantitativi (MIC). I pannelli in uso sono pannelli Sensititre (Trek diagnostic systems). La lettura si esegue dopo 18 ore.

La definizione di antibiotico-sensibilità e resistenza prende in considerazione la MIC reale del germe saggiato, cui vengono applicate le Categorie di Interpretazione EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).²¹⁰

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software: MedCalc® (version 11. 1. 1. 0).

Le sensibilità antibiotiche dei ceppi sono espresse in percentuale, ed è stato operato un confronto attraverso il chi-square test. Le MIC, descritte tramite mediana e range interquartile, sono state confrontate studiando i dati in ranghi con il Mann-Whitney test per dati indipendenti a due code.

Per le variabili cliniche continue è stata testata la differenza tra le medie tramite il t-test per dati indipendenti.

I risultati sono considerati significativi per valori di $p < 0.05$.

8.4 Risultati

Cinquantasette pazienti con FC e colonizzazione cronica delle vie aeree da P.A. sono stati arruolati. Di questi, 44 avevano più di 20 anni, 13, erano più giovani di 20 anni. In totale 276, 334, 342, 392 colture microbiologiche sono state analizzate rispettivamente nel 2010, 2011, 2012 e 2013. Nel gruppo di pazienti adulti sono state considerate rispettivamente 212, 279, 289, 323 colture; nel gruppo pediatrico le analisi sono state condotte rispettivamente su 64, 55, 53, 62 colture.

La tabella 19 mostra le caratteristiche della popolazione al 31 dicembre 2013.

	Tutti i pz (n=57)	Pz ≥20 anni (n=44)	Pz <20 anni (n=13)
Età media (SD)	30,17 (10,43)	34,20 (8,19)	15,85 (2,61)
Sesso femminile (%)	70,17	65,91	84,61
Eterozigosi Delf508 (%)	38,60	38,64	38,46
Omozigosi Delf508 (%)	10,53	4,54	30,76
Insufficienza pancreatica (%)	82,46	79,54	100,00
Diabete (%)	29,83	38,64	0,00
FEV₁% pred medio negli ultimo 6 mesi (SD)	68,13 (23,97)	67,33 (25,18)	70,72 (20,25)

Tabella 19. Caratteristiche della popolazione arruolata e dei due gruppi determinate in base all'età, al 31 dicembre 2013

La prevalenza della sensibilità antibiotica per anno nei 57 pazienti totali è mostrata in Figura 19. Come si può osservare, essa è diminuita nel periodo osservato per la Ciprofloxacina da 47.11% nel 2010 a 30.87% nel 2013 ($p < 0.0001$), per la Levofloxacina da 41.66% a 30.10% ($p < 0.01$) e per il Ceftazidime da 82.61% a 79.34% (n.s.); è invece aumentata per la Colistina da 93.12% a 98.47% ($p < 0.001$) e per Amikacina da 0% a 48.72% ($p < 0.0001$); la suscettibilità per il Meropenem è invece rimasta costante durante il periodo osservato (72.08% nel 2010, 71.17% nel 2013).

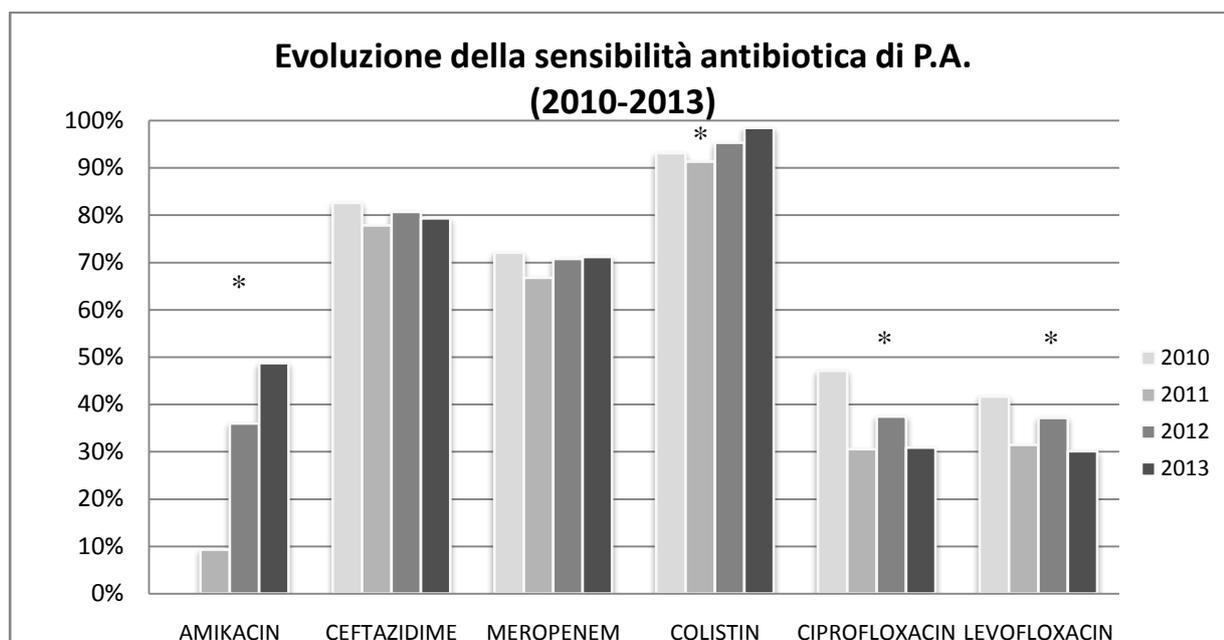


Figura 19. La suscettibilità antibiotica di P.A. determinata secondo le categorie interpretative di EUCAST nei 57 pazienti totali

L'analisi delle MIC è stata condotta comparando le MIC per ogni singolo antibiotico, ed ha confermato il trend mostrato dall'analisi della prevalenza di sensibilità, con un aumento significativo nel periodo studiato per i Fluorochinoloni e una diminuzione per Amikacina e Colistina. (Tabella 20).

MIC P.A.	Tutti i pz 2010	Tutti i pz 2013	Mann-Whitney
AMIKACINA	16 [16-32]	16 [8-16]	$p < 0.0001$
CEFTAZIDIME	2 [1-8]	2 [1-8]	ns
COLISTINA	1 [1-2]	1 [0.5-2]	$p < 0.01$
MEROPENEM	0.5 [0.25-4]	1 [0.25-4]	ns
CIPROFLOXACINA	1 [0.25-2]	2 [0.5-2]	$p < 0.001$
LEVOFLOXACINA	2 [2-2]	4 [4-4]	$p < 0.0001$

Tabella 20. MIC mediane IQR nella popolazione di 57 pazienti nel 2010 e 2013.

In Figura 20 si mostra l'evoluzione della prevalenza della sensibilità di P.A. nei pazienti con età <20 anni. Durante il periodo studiato, la sensibilità è diminuita per Ciprofloxacina da 52.62% a 25.81% ($p<0.01$), per Levofloxacina da 54.70% a 27.42% ($p<0.01$) e per Meropenem da 73.44% a 67.74% (n.s.); è invece aumentata per Amikacina da 0% a 48.39% ($p<0.0001$) e, pur se non significativamente per Colistina da 96.87% a 100%. La sensibilità per Ceftazidime non ha presentato differenze significative (90.63% nel 2010, 88.71% nel 2013).

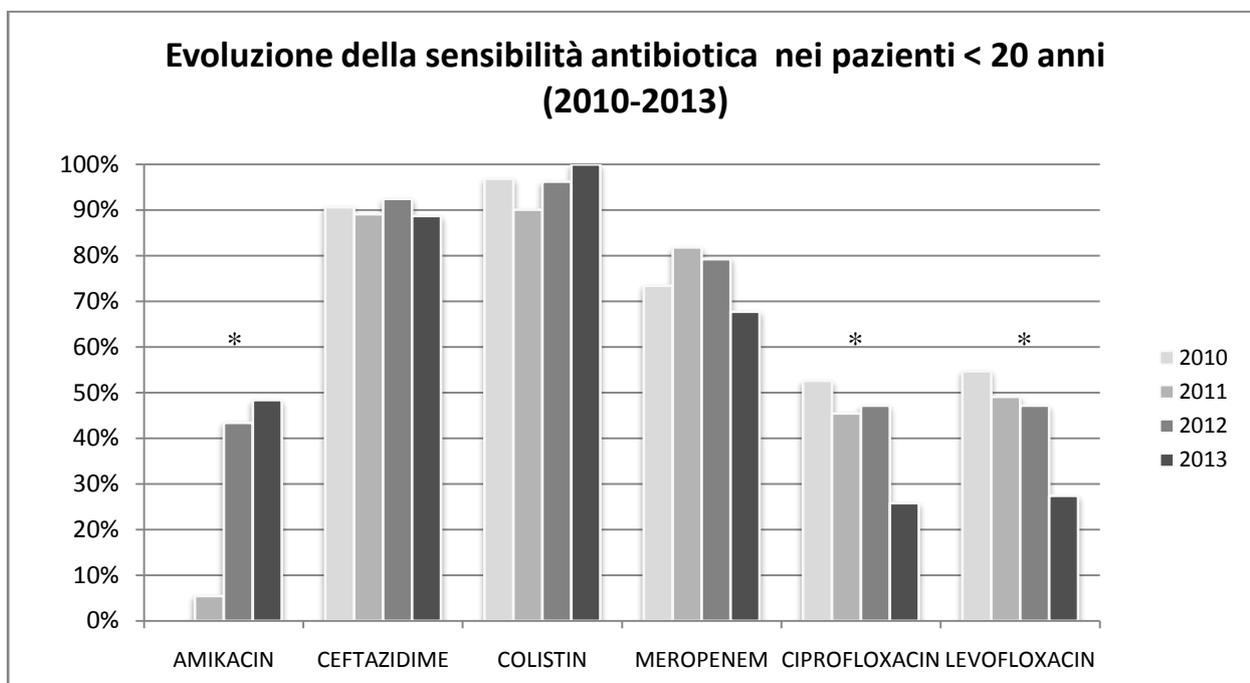


Figura 20. La suscettibilità antibiotica di P.A. determinata secondo le categorie interpretative di EUCAST nei 13 pazienti con età inferiore ai 20 anni

L'analisi delle MIC (Tabella 21) ha confermato questo trend, con un significativo aumento per i Fluorochinoloni e una diminuzione per Amikacina e Colistina.

MIC P.A.	Pz <20 anni 2010	Pz <20 anni 2013	Mann-Whitney
AMIKACINA	16 [16-16]	16 [8-16]	p<0,0001
CEFTAZIDIME	2[0,75-4]	1[0,625-3,5]	ns
COLISTINA	1[1-2]	1[0,5-1]	p<0,01
MEROPENEM	0,5 [0,12-1]	0,5 [0,25-4]	ns
CIPROFLOXACINA	0,5 [0,12-2]	2 [0,875-2]	p<0,001
LEVOFLOXACINA	1 [0,5-4]	4 [1-4]	p<0,001

Tabella 21. MIC mediane IQR nei 13 pazienti con età inferiore a 20 anni nel 2010 e 2013.

L'analisi dell'andamento della sensibilità nella popolazione adulta ha presentato trend simile nel periodo studiato, come mostrato in Figura 21. Si è assistito ad una riduzione della sensibilità per

Ciprofloxacina da 44.35% a 32.2% ($p < 0.01$) e per Levofloxacina, da 37.73% a 30.96% (ns), ad un aumento della sensibilità per Colistina da 93.88% a 98.14% ($p < 0.05$) ed Amikacina da 0% a 48.3% ($p < 0.0001$); non si sono evidenziate differenze significative nell'andamento delle sensibilità per Ceftazidime (da 80.19% a 77.40%) e Meropenem (da 71.71% a 71.83%).

Le MIC per Levofloxacina e Ciprofloxacina sono aumentate nel periodo studiato, mentre quelle per Amikacina sono diminuite (Tabella 22).

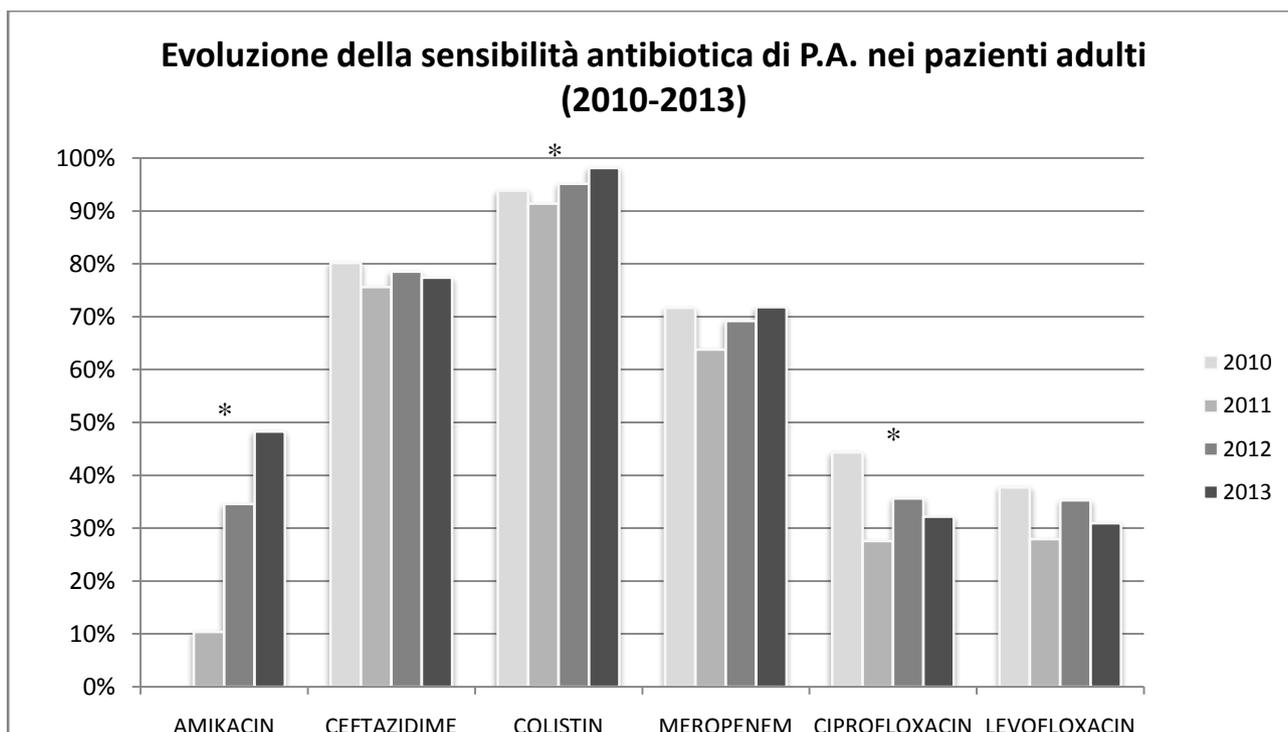


Figura 21. La suscettibilità antibiotica di P.A. determinata secondo le categorie interpretative di EUCAST nei 44 pazienti con età maggiore o uguale a 20 anni

MIC P.A.	Adulti 2010	Adulti 2013	Mann-Whitney
AMIKACINA	16 [16-32]	16 [8-16]	p<0.0001
CEFTAZIDIME	2[1-8]	2[1-8]	ns
COLISTINA	1[1-2]	1 [0.5-2]	ns
MEROPENEM	0.5 [0.25-4]	1 [0.25-4]	ns
CIPROFLOXACINA	1 [0.25-2]	2 [0.5-2]	p<0.01
LEVOFLOXACINA	2 [0.5-4]	4 [1-4]	p<0.01

Tabella 22. MIC mediane IQR nei 44 pazienti con età maggiore o uguale a 20 anni, nel 2010 e 2013.

È stata confrontata la prevalenza di sensibilità antibiotica nel 2010 e nel 2013 tra pazienti con età inferiore a 20 anni e pazienti adulti. La sensibilità è risultata maggiore (Figura 22) nei pazienti

pediatriche nel 2010 per tutti gli antibiotici studiati, e significativamente per la Levofloxacina ($p < 0.05$); l'analisi delle MIC (Tabella 23) ha mostrato valori più alti negli adulti per Levofloxacina, Amikacina e Ceftazidime.

Nel 2013 si riportano sensibilità simili (Figura 22), in assenza di significative differenze tra i gruppi. L'analisi delle MIC (Tabella 18) ha mostrato valori più elevati nel gruppo degli adulti per Colistina e Ceftazidime.

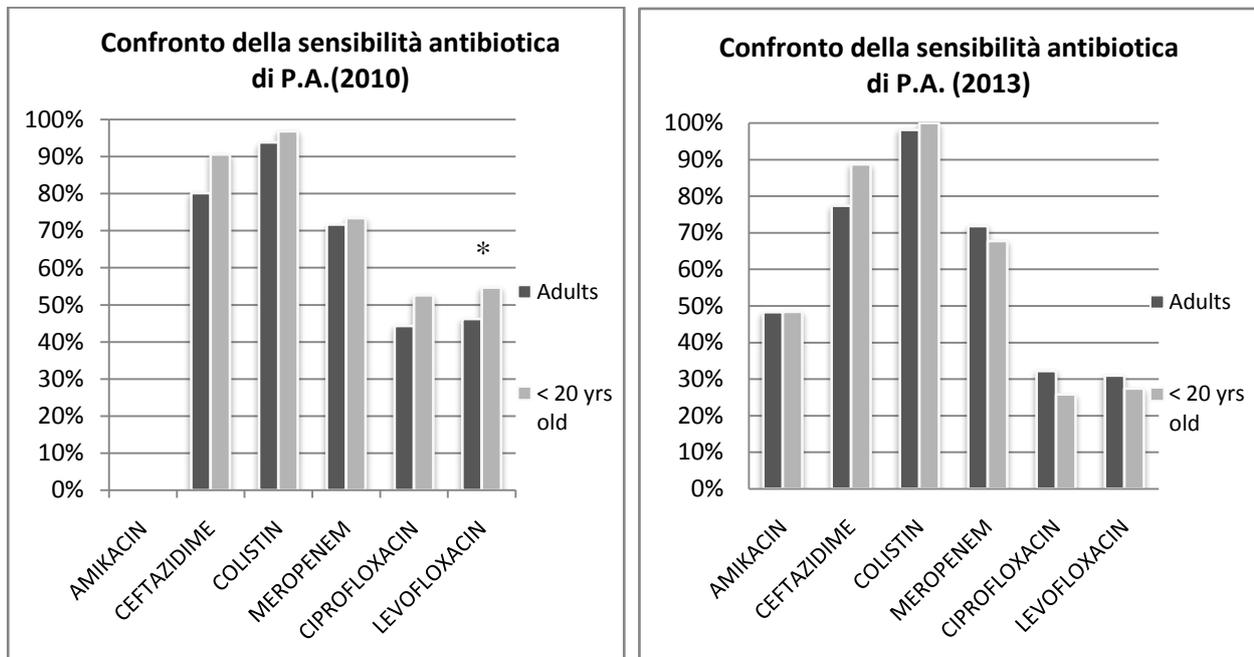


Figura 22. Confronto della sensibilità antibiotica secondo le categorie di interpretazione di EUCAST nel 2010 e nel 2013, tra i 13 pazienti con età inferiore a 20 anni e i 44 pazienti con età maggiore o uguale a 20 anni.

MIC P.A.	<20 anni 2010	adulti 2010	Mann-Whitney	<20 anni 2013	adulti 2013	Mann-Whitney
AMIKACINA	16[16-16]	16 [16-32]	$p < 0.05$	16 [8-16]	16 [8-16]	ns
CEFTAZIDIME	2[0.75-4]	2[1-8]	$p < 0.05$	1[0.625-3.5]	2[1-8]	$p < 0.01$
COLISTINA	1[1-2]	1[1-2]	ns	1[0.5-1]	1 [0.5-2]	$p < 0.01$
MEROPENEM	0.5 [0.12-1]	0.5 [0.25-4]	ns	0.5[0.25-4]	1[0.25-4]	ns
CIPROFLOXACINA	0.5 [0.12-2]	1 [0.25-2]	ns	2[0.87-2]	2 [0.5-2]	ns
LEVOFLOXACINA	1 [0.5-4]	2 [0.5-4]	$p < 0.05$	4 [1-4]	4 [1-4]	ns

Tabella 23. MIC mediane IQR nei 44 pazienti con età maggiore o uguale a 20 anni. e nei 13 pazienti con età inferiore ai 20 anni nel 2010 e 2013.

Infine, la popolazione pediatrica è stata suddivisa in due gruppi in base ai cicli antibiotici orali e endovenosi svolti all'anno (>3 vs ≤ 3 cicli/anno): nei pazienti che hanno ricevuto più di 3 cicli

all'anno (n=5, 110 esami colturali esaminati), le MIC per Levofloxacin (P < 0.0001), Ciprofloxacina (P < 0.0001), Meropenem (P < 0.001) e Ceftazidime (P < 0.0001) sono risultate maggiori che nei pazienti sottoposti a 3 o meno cicli all'anno (n= 4, 108 esami colturali esaminati). Le MIC per Amikacina (P < 0.05) e Colistina (P < 0.001) erano maggiori nel gruppo meno trattato. In Tabella 24 si presenta il numero totale dei cicli antibiotici eseguiti nei 4 anni nella popolazione di età inferiore a 20 anni. Sono stati inclusi anche i cicli di tobramicina endovenosa ed aerosolica.

Cicli di Terapia antibiotica	2010	2011	2012	2013
Amikacina		4	5	1
Tobramicina endovena	2	6	11	11
Ceftazidime	2	7	11	11
Meropenem	1	5	8	3
Colistina aerosol	12	33	48	35
Tobramicina aerosol	44	39	47	40
Ciprofloxacina	6	9	8	3
Levofloxacin	3	3	9	7

Tabella 24. Numero totale di cicli antibiotici eseguiti durante ogni anno del periodo in esame nella popolazione con età minore ai 20 anni.

Appare come gli antibiotici più utilizzati ogni anno siano quelli somministrati per via aerosolica, Tobramicina e Colistina. L'uso di Amikacina si concentra negli anni 2011 e 2012. L'uso di Ceftazidime è progressivamente crescente. Il numero di cicli antibiotici annuo con Ciprofloxacina e Levofloxacin si mantiene pressoché costante.

8.5 Discussione

Sono stati raccolti e presentati i dati relativi a 57 pazienti di un singolo centro FC tra il 2010 e il 2013. La numerosità delle osservazioni effettuate, l'applicazione di metodica microbiologica standardizzata a livello Europeo²¹⁰, e l'estrazione dei dati da due database informatizzati con inserimento prospettico, donano robustezza alle osservazioni prodotte.

Il lavoro presentato si caratterizza inoltre per l'originalità della tematica affrontata e trova collocazione nel panorama degli studi osservazionali descrittivi in FC. La novità riguarda anche l'inclusione dei pazienti con sola colonizzazione cronica, peculiare per le sue caratteristiche. Punto di forza è sicuramente l'aver incluso anche una piccola coorte in età evolutiva e di averla confrontata con una popolazione di adulti. In letteratura esiste uno studio che prende in considerazione pazienti di età pediatrica, con i limiti di non essere recente e di analizzare un periodo di soli 2 anni.²⁰⁷

Lo studio ha evidenziato un'evoluzione nelle resistenze antibiotiche nei ceppi di P. A. isolati dalla popolazione di pazienti colonizzati cronici nel corso dei quattro anni studiati.

La sensibilità per i Fluorochinoloni si caratterizza per una bassa prevalenza già nel primo anno studiato, e tende a ridursi ulteriormente negli anni successivi. Abbiamo mostrato comportamenti simili per Ciprofloxacina e Levofloxacina, probabilmente legati al comune meccanismo di resistenza adottato da P.A.²⁰² I dati relativi alla Ciprofloxacina, per la quale è descritto un declino di sensibilità da 47.11% nel 2010 a 30.87% nel 2013 per l'intera popolazione, sono confrontabili con altri presentati in studi trasversali negli USA (34.4%),²⁰⁴ Regno Unito (43.6%)¹³⁴; sensibilità più frequente è riportata in Germania (59.2%),²¹¹ Austria (85%).²¹²

La sensibilità di Meropenem si è mantenuta alta e costante durante il periodo studiato. Dati simili sono riportati in letteratura.^{211,212} Nella popolazione adulta, nonostante il Meropenem sia uno degli antibiotici più utilizzati, si osserva come la prevalenza di ceppi sensibili ad esso aumenti in modo significativo.

Nel nostro studio rimane alta, con un lieve non significativo calo, anche la sensibilità per Ceftazidime, in contrasto ai dati della Germania (56-75%)²¹¹, Regno Unito (60.4%)¹³⁴, in linea con i dati USA (80.5%)²⁰⁴ e italiani precedenti (80%).²⁰⁸

L'Amikacina ha nel nostro studio un comportamento particolare, con una sensibilità che aumenta durante i 4 anni esaminati per arrivare ad una prevalenza del 48%, in contrasto con quanto descritto sia nella prevalenza (89% in Austria²¹², 69,5% in Italia²⁰⁸), sia per l'evoluzione di questa (dal 75.8% negli USA nella coorte del 1995 a 67.3% nella coorte del 2008).

La sensibilità della Colistina è la più alta nel nostro studio, e tende ad aumentare significativamente, in accordo con i dati italiani precedentemente pubblicati, ma in contrasto con i dati inglesi. È importante notare che nei nostri pazienti, la colistina è stata somministrata solo per via aerosolica; questa via di somministrazione appare scevra da un cambiamento della suscettibilità, nonostante la lunga durata dei trattamenti.

Gli studi citati hanno comunque utilizzato diversi sistemi di categorie di interpretazione e per questo i dati sono solo parzialmente comparabili. Infatti non tutti gli studi hanno analizzato l'andamento delle MIC, che avrebbe consentito una comparazione più valida.

La peculiarità del nostro studio risiede anche nell'analisi dei dati relativi alla popolazione con età inferiore ai 20 anni. In questo gruppo si è notato come nel 2010 la prevalenza della sensibilità agli antibiotici testati fosse maggiore che negli adulti, mentre nel 2013 queste differenze non sono state più dimostrabili, come ad indicare una riduzione della sensibilità più importante nel gruppo di pazienti più giovani. Nel 2013 ad esempio la prevalenza della sensibilità per i Fluorochinoloni nei pazienti con meno di 20 anni è addirittura inferiore agli adulti.

L'analisi dei valori di MIC in questo gruppo ha mostrato un'influenza da parte del numero di cicli antibiotici.

In conclusione, l'evoluzione della sensibilità antibiotica di P.A. attestata in questo studio, spinge a considerare attentamente l'uso degli antibiotici nel corso degli anni in questi pazienti. In particolare, l'uso empirico di Fluorochinoloni è questionabile, dato gli alti livelli di resistenza riscontrati. Posto che l'antibioticoterapia rimane fondamentale nella gestione della patologia polmonare in FC, è necessario che l'antibiogramma sia di guida all'uso della terapia antibiotica, come scelta del miglior agente terapeutico, ma anche nel monitoraggio dell'evoluzione della sensibilità di P.A.

È questo un modo appropriato di conoscere la propria realtà e di monitorarla nel tempo, guidando verso l'uso attento, informato e consapevole della terapia antibiotica.

9. CONCLUSIONI

La malattia polmonare da FC è caratterizzata da infiammazione ed infezione, strettamente embricate tra loro. La disfunzione e disregolazione di diversi pathway infiammatori conduce ad una risposta infiammatoria molto importante ma inefficace, dalle caratteristiche ancora non completamente chiarite. La variabilità genetica e l'assenza di una correlazione genotipo-fenotipo chiara, non consentono una previsione dell'andamento clinico del singolo paziente. La storia clinica è caratterizzata da un susseguirsi di fatti infettivi acuti, che progressivamente conducono alla possibile colonizzazione cronica delle vie aeree e alla destrutturazione di queste, con danno cronico che esita nell'insufficienza respiratoria. Il tempismo e l'adeguatezza degli interventi terapeutici sono fondamentali nel limitare la progressione della malattia. Da sempre un marker capace di prevedere l'insorgenza di una esacerbazione, è oggetto di ricerca. La molteplicità dei fattori che influiscono però sull'infiammazione e sulle condizioni delle vie aeree ha reso questa ricerca molto difficile.

I metaboliti dell'arginina e di ADMA appaiono promettenti, dati i positivi riscontri in asma e nell'infiammazione allergica. Non è però di univoca interpretazione quanto da noi trovato a livello di EBC. I dati disponibili possono dare spazio a una riflessione sul metabolismo di ADMA, che però merita ulteriore approfondimento in studi futuri, per poter confermare quest'impressione. I dati sul plasma sembrano più in linea con la letteratura che vede ADMA marker di infiammazione; mettono invece in discussione il metabolismo dell'arginina a questo livello, cui sarebbe appropriato affiancare, in un futuro studio, anche il dosaggio degli altri prodotti finali dell'attività dell'arginasi, come l'ornitina. L'assenza di correlazione con la funzionalità respiratoria sembra in linea con la grande variabilità esistente a livello delle vie aeree e le non chiarite dinamiche alla base dell'infiammazione soprattutto in stadi di malattia precoce come quelli dei pazienti arruolati.

Proprio in considerazione di questa variabilità di profili, un approccio di tipo metabolomico potrebbe consentire la stratificazione dei pazienti e il riscontro di profili più o meno predisposti alla riacutizzazione respiratoria e alla progressione del danno polmonare.

Tra gli obiettivi nella gestione del paziente con FC, esiste anche la necessità di un outcome ripetibile, agevole e poco invasivo per guidare la terapia e monitorare la storia clinica del paziente. La RMN torace, scevra di radiazioni ionizzanti, possiede queste caratteristiche. Tramite l'utilizzo della sequenza DWI può identificare i pazienti con peggioramento clinico e dare una misura quantitativa e "geografica" dell'infiammazione, utile sicuramente in ambito clinico, ma anche in campo di ricerca.

Un ulteriore obiettivo nella gestione dell'infezione e infiammazione del paziente con FC è il monitoraggio delle resistenze antibiotiche. Questi dati rappresentano infatti un aiuto nel guidare la

scelta dell'antibiotico più appropriato, ma anche un modo di acquisire consapevolezza del setting in cui si lavora. Ne derivano in ambito clinico un uso più informato e consapevole della terapia antibiotica, anche empirica. Per questo un'estensione sistematica nel tempo di questo tipo di dati potrebbe migliorare la gestione del paziente.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Egan M: Cystic fibrosis. In: Nelson Textbook of Pediatric, 19th Ed. Kliengman, Stanton, St.Geme, Schor, Behrman, eds. Elsevier Saunder publ, Philadelphia, 2011, chap 395.
2. Boucher RC: Fibrosi Cistica. In: Harrison Principi di Medicina Interna, XVII Ed. Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo, eds. McGrawHill publ,2008, pp 1585-1588.
3. Kumar M: Malattie dell'infanzia e dell'adolescenza. In: Le basi patologiche delle malattie. Robbins and Contran eds, VII Ed. Elsevier publ, 2005, pp 489-495
4. Corbetta C, Seia M, Bassotti A, Ambrosioni A, Giunta A, Padoan R: Screening for cystic fibrosis in newborn infants: results of a pilot programme based on a two tier protocol (IRT/DNA/IRT) in the Italian population. *J Med Screen* 2002; 9: 60-63.
5. Castellani C, Bonizzato A, Cabrini G, Mastella G: Newborn screening strategy for cystic fibrosis: a field study in an area with high allelic heterogeneity. *Acta Paediatr* 1997; 86: 497-502.
6. Cystic Fibrosis Genetic Consortium. Cystic Fibrosis Genetic Data Base. URL: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>.
7. Rendine S, Calafell F, Cappello N, Gagliardini R, Caramia G, Rigillo N, Silveti M, Zanda M, Miano A, Battistini F, Marianelli M, Taccetti G, Diana MC, Romano L, Romano C, Giunta A, Padoan R, Pianaroli A, Raia V, De Ritis G, Battistini A, Grzincich G, Iapichino L, Pardo F, Antonelli M, Quattrucci S, Lucidi V, Castro M, Santini B, Castello M, Guanti G, Leoni GB, Cao A, Toffoli C, Lucci E, Vullo C, Torricelli F, Sbernini F, Romeo G, Ronchetto P, Seia M, Rossi A, Ferrari M, Cremonesi L, Salvatore F, Castaldo G, D'Alcamo E, Maggio A, Sangiuolo F, Dallapiccola B, Maceratesi P, Bisceglia L, Gasparini P, Carbonara A, Bonizzato A, Cabrini G, Bombieri C, Pignatti PF, Borgo G, Castellani C, Villani A, Arduino C, Salvatore D, Mastella G, Piazza A: Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann Hum Genet* 1997; 61: 411-424.
8. Bonizzato A, Bisceglia L, Marigo M, Nicolis E, Bombieri C, Castellani C, Borgo G, Zelante L, Mastella G, Cabrini G, Gasparini P, Pignatti PF. Analysis of the complete coding region of the CFTR gene in a cohort of CF patients from Northeastern Italy: identification of 90% of the mutations. *Hum Genet* 1995; 95: 397-402.
9. Nissim-Rafinia M, Linde L, Kerem B. The CFTR Gene: Structure, Mutations and Specific Therapeutic Approaches. In: *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A 73 eds. *Prog Respir Res*. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 2-10
10. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium: Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 329: 1308-13.

11. Stratford FLL, Bear CE: Structure of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. In: Cystic Fibrosis in the 21st Century. Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A eds. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 29-37.
12. Zielenski J: Genotype and phenotype in cystic fibrosis. Respiration 2000; 67:117-133.
13. Trezise AEO: Exquisite and Multilevel Regulation of CFTR Expression. In: Cystic Fibrosis in the 21st Century. Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A eds. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 11-20.
14. Tarran R, Button B, Picher M, Paradiso AM, Ribeiro CM, Lazarowski ER, Zhang L, Collins PL, Pickles RJ, Fredberg JJ, Boucher RC: Normal and cystic fibrosis airway surface liquid homeostasis. The effects of phasic shear stress and viral infections. J Biol Chem. 2005 Oct 21;280(42):35751-9.
15. Boucher RC: Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. Trends Mol Med. 2007 Jun;13(6):231-40.
16. Gentsch M, Dang H, Dang Y, Garcia-Caballero A, Suchindran H, Boucher RC, Stutts MJ: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impedes proteolytic stimulation of the epithelial Na⁺ channel. J Biol Chem 2010 Oct 15;285(42):32227-32.
17. Donaldson SH, Boucher RC: Sodium Channel and Cystic Fibrosis. Chest 2007; 132: 1631-1636.
18. Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, Hiatt P, McCoy K, Wilson CB, Inglis A, Smith A, Martin TR, Ramsey BW: Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2001 Nov;32(5):356-66.
19. Long FR, Williams RS, Castile RG: Structural airway abnormalities in infants and young children with cystic fibrosis. J Pediatr. 2004 Feb;144(2):154-61.
20. Bridges N, Spowart K: Diabetes in Cystic fibrosis. In: Cystic Fibrosis in the 21st Century. Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe 75 A eds. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 278-283.
21. Thorpe-Beston JG: Fertility, Contraception, Incontinence and Pregnancy. In: Cystic Fibrosis in the 21st Century. Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A eds. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 264-269.
22. Cornacchia M, Zenorini A, Perobelli S, Zanolla L, Mastella G, Braggion C: Prevalence of urinary incontinence in women with cystic fibrosis. Br J Urol 2001;88:44-48
23. Elkin SL, Fairney A, Burnett S, Kemp M, Kyd P, Burgess J, Compston JE, Hodson ME: Vertebral deformities and low bone mineral density in adults with cystic fibrosis: a cross-sectional study. Osteoporos Int 2001;12:366-372.

24. Naehrlich L, Ballmann M, Davies J, Derichs N, Gonska T, Hjelte L, van Konigsbruggen-Rietschel S, Leal T, Melotti P, Middleton P, Tümmler B, Vermeulen F, Wilschanski M: Nasal potential difference measurements in diagnosis of cystic fibrosis: An international survey. *Journal of Cystic Fibrosis* 2014 Jan; 13(1): 24- 28
25. Karczeski BA, Cutting GR: Diagnosis of Cystic Fibrosis, CFTRrelated Disease and Screening. In: *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A eds. *Prog Respir Res*. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 69-76.
26. Wainwright C, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MV, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe Sm, Waltz D, Boyle MP for the TRAFFIC and TRANSPORT Study Groups. Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015; 373:220-231
27. Dorfman R, Zielenski J: Genotype-Phenotype Correlations in Cystic Fibrosis. In: *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A eds. *Prog Respir Res*. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 61-68
28. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual data report 2013.
29. Watt AP, Courtney J, Moore J, et al. Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis. *Thorax* 2005;60:659–64.
30. Bonfield TL, Konstan MW, Berger M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:72–8.
31. Karp CL, Flick LM, Park KW, Softic S, Greer TM, Keledjian R, et al. Defective lipoxinmediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat Immunol* 2004;5:388–92.
32. Perez A, van Heeckeren AM, Nichols D, Gupta S, Eastman JF, Davis PB. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in cystic fibrosis lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Aug;295(2):L303-13.
33. Norman E, Kreiselmeier, Nathan C, Kraynack, Deborah A, Corey, Thomas J, Kelley: Statin-mediated correction of STAT1 signaling and inducible nitric oxide synthase expression in cystic fibrosis epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. Dec 2003;Vol. 285no. 6: pp. L1286-L1295
34. Kelley TJ, Elmer HL, Corey DA: Reduced Smad3 protein expression and altered transforming growth factor-beta1-mediated signaling in cystic fibrosis epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Dec;25(6):732-8
35. Dhooghe B, Noël S, Huaux F, Leal T. Lung inflammation in cystic fibrosis: pathogenesis and novel therapies. *Clin Biochem*. 2014 May;47(7-8):539-46
36. Elizur A, Cannon CL, Ferkol TW. Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest* 2008;133:489–95.

37. Cohen-Cymbarknoh M, Kerem E, Ferkol T, Elizur A. Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax*. 2013 Dec;68(12):1157-62.
38. Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS, Davis PB. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Feb;292(2):L383-95.
39. Brodli M, McKean MC, Johnson GE, et al. Ceramide is increased in the lower airway epithelium of people with advanced cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:369–75.
40. Teichgräber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmüller J, Wilker B, De Oliveira-Munding CC, et al. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med* 2008;14:382–91
41. 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;184:75–81.
42. Khan, T. Z., J. S. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F. J. Accurso, and D. W. H. Riches. 1995. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 151:1075–1082.
43. Balough, K., M. McCubbin, M. Weinberger, W. Smits, R. Ahrens, and R. Fick. 1995. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol*.
44. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutiérrez JP, Hull J, Olinsky A, Phelan EM, Robertson CF, Phelan PD. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Oct;156(4 Pt 1):1197-204.
45. Tirouvanziam R, De Bentzmann S, Hubeau C, Hinrasky J, Jacquot J, Péault B, Puchelle E: "Inflammation and Infection in Naive Human Cystic Fibrosis Airway Grafts". *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Vol. 23, No. 2 (2000): pp. 121-127.
46. Armstrong DS, Hook SM, Jansen KM, Nixon GM, Carzino R, Carlin JB, Robertson CF, Grimwood K. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol*. 2005 Dec;40(6):500-10.
47. Ranganathan SC, Parsons F, Gangell C, et al. Evolution of pulmonary inflammation and nutritional status in infants and young children with cystic fibrosis. *Thorax* 2011;66:408–13.
48. Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, Hodson ME, Kharitonov SA: "Increased Leukotriene B4 and Interleukin-6 in Exhaled Breath Condensate in Cystic Fibrosis". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 167, No. 8 (2003), pp. 1109-1112
49. Brennan S, Cooper D, Sly PD. Directed neutrophil migration to IL-8 is increased in cystic fibrosis: a study of the effect of erythromycin. *Thorax* 2001;56:62–4.

50. Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:137–42
51. Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zemanick ET. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Nov 1;186(9):857–65.
52. Brennan S, Sly PD, Gangell CL, et al. Alveolar macrophages and CC chemokines are increased in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2009;34:655–61
53. Hubeau C, Lorenzato M, Couetil JP, et al. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol*. 2001 Apr;124(1):69–76.
54. Petit-Bertron AF, Tabary O, Corvol H, et al. Circulating and airway neutrophils in cystic fibrosis display different TLR expression and responsiveness to interleukin-10. *Cytokine* 2008;41:54–60
55. Hubeau C, Le Naour R, Abely M, et al. Dysregulation of IL-2 and IL-8 production in circulating T lymphocytes from young cystic fibrosis patients. *Clin Exp Immunol* 2004;135:528–34.
56. Tan HL, Regamey N, Brown S, et al. The Th17 pathway in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:252–8.
57. Heeckeren A, Walenga R, Konstan MW, et al. Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Invest* 1997;100:2810–15
58. Jones AM. Anaerobic bacteria in cystic fibrosis: pathogens or harmless commensals? *Thorax* 2011;66:558–9
59. Chatteraj SS, Ganesan S, Jones AM, et al. Rhinovirus infection liberates planktonic bacteria from biofilm and increases chemokine responses in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Thorax* 2011;66:333–9.
60. Chaudhary N, Datta K, Askin FB, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates epithelial cell response to *Aspergillus* and resultant pulmonary inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:301–10.
61. McNally P, Ervine E, Shields MD, et al. High concentrations of pepsin in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis are associated with high interleukin-8 concentrations. *Thorax* 2011;66:140–3.
62. Kettle AJ, Chan T, Osberg I, et al. Myeloperoxidase and protein oxidation in the airways of young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Dec 15;170(12):1317–23. *Am J Respir Crit Care Med*
63. Galli F, Battistoni A, Gambari R, Pompella A, Bragonzi A, Pilolli F, et al. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822:690–713.

64. Taggart C, Coakley RJ, Grealley P, Canny G, O'Neill SJ, McElvaney NG. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Jan;278(1):L33-41.
65. Barnes PJ, Belvisi MG (1993) Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 48(10):1034–1043
66. Kharitonov SA, Wells AU, O'Connor BJ, Cole PJ, Hansell DM, Logan-Sinclair RB, Barnes PJ (1995) Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 151(6):1889–189
67. Suri R, Paraskakis E, Bush A. Alveolar, but not bronchial nitric oxide production is elevated in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2007 Dec;42(12):1215-21.
68. Saleh D , Ernst P , Lim S , Barnes PJ , Giaid A . Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid . *FASEB J* . 1998 ; 12 (11) : 929 – 937
69. Brindicci C , Kharitonov S , Ito M , et al . Nitric oxide synthase isoenzyme expression and activity in peripheral lung tissue of patients with chronic obstructive pulmonary disease . *Am J Respir Crit Care Med* . 2010 ; 181 : 21 - 30
70. Silkoff, D. Robin Taylor and Noe Zamel C. George, Hartmut Grasemann, Ian D. Pavord, Felix Ratjen, Philip E. Peter J. Barnes, Raed A. Dweik, Arthur F. Gelb, Peter G. Gibson, Steven. Exhaled Nitric Oxide in Pulmonary Diseases :A Comprehensive Review. *Chest* 2010;138:682-692
71. Kelley TJ, Drumm ML. Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells. *J Clin Invest*. 1998 Sep 15;102(6):1200-7.
72. Grasemann H, Knauer N, Büscher R, Hübner K, Drazen JM, Ratjen F . Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene . *Am J Respir Crit Care Med* . 2000 ; 162 (6) : 2172 – 2176
73. Steagall WK, Elmer HL, Brady KG, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent regulation of epithelial inducible nitric oxide synthase expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:45–5040
74. Thomas SR, Kharitonov SA, Scott SF, Hodson ME, Barnes PJ. Nasal and exhaled nitric oxide is reduced in adult patients with cystic fibrosis and does not correlate with cystic fibrosis genotype. *Chest*. 2000 Apr;117(4):1085-9
75. Kreiselmeier NE, Kraynack NC, Corey DA, Kelley TJ: Statin-mediated correction of STAT1 signaling and inducible nitric oxide synthase expression in cystic fibrosis epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. Dec 2003;Vol. 285no. 6: pp. L1286-L1295.
76. Hubert D , Aubourg F , Fauroux B , et al . Exhaled nitric oxide in cystic fi brosis: relationships with airway and lung vascular impairments . *Eur Respir J* . 2009 ; 34 (1) : 117 – 124

77. Franklin PJ, Hall GL, Moeller A, Horak F Jr, Brennan S, Stick SM. Exhaled nitric oxide is not reduced in infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2006 Feb;27(2):350-3.
78. de Winter-de Groot KM, van der Ent CK. Nitric oxide in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005 ; 4 (Suppl 2): 25 - 29 .
79. Dotsch J, Demirakca S, Terbrack HG, et al. Airway nitric oxide in asthmatic children and patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1996; 9:2537–2540
80. Keen C, Gustafsson P, Lindblad A, Wennergren G, Olin AC. Low levels of exhaled nitric oxide are associated with impaired lung function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2010 Mar;45(3):241-8
81. Ojoo J C, Mulrennan S A, Kastelik J A, et al. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis. *Thorax* 2005 60: 22-26
82. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax*. 1998 Aug;53(8):680-4
83. Lundberg JO, Nordvall SL, Weitzberg E, Kollberg H, Alving K. Exhaled nitric oxide in paediatric asthma and cystic fibrosis.. *Arch Dis Child*. 1996 Oct;75(4):323-6.
84. Balfour-Lynn IM, Lavery A, Dinwiddie R. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1996 Oct;75(4):319-22
85. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, Pavord ID, Ratjen F, Silkoff PE, Taylor DR, Zamel N. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. *Chest*. 2010 Sep;138(3):682-92. doi: 10.1378/chest.09-2090.
86. Grasemann H, Ioannidis I, Tomkiewicz RP, de Groot H, Rubin BK, Ratjen F. Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch Dis Child*. 1998 Jan;78(1):49-53
87. Warren JB, Loi R, Rendell NB, Taylor GW. Nitric oxide is inactivated by the bacterial pigment pyocyanin. *Biochem J*. 1990 Mar 15;266(3):921-3.
88. Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J* 2004;18:1746–1748.
89. Li H, Romieu I, Sienna-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, Estela Del Rio- Navarro B, Kistner EO, Gjessing HK, Lara-Sanchez Idel C, Chiu GY, London SJ. Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:119–126.
90. Wells SM, Buford MC, Migliaccio CT, Holian A.: Elevated asymmetric dimethylarginine alters lung function and induces collagen deposition in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Feb;40(2):179-88.

91. Cardounel AJ, Cui H, Samouilov A, Johnson W, Kearns P, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. *J Biol Chem* 282: 879–887, 2007
92. Klein E, Weigel J, Buford MC, Holian A, Wells SM. Asymmetric dimethylarginine potentiates lung inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Dec;299(6):L816-25.
93. Wells SM, Holian A. Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 May;36(5):520-8.
94. Grasemann H, Al-Saleh S, Scott JA, Shehnaz D, Mehl A, Amin R, Rafii M, Pencharz P, Belik J, Ratjen F. Asymmetric dimethylarginine contributes to airway nitric oxide deficiency in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 May 15;183(10):1363-8
95. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141–1146.
96. Schulze HL, Hanefeld C, Bartling A, Osterziel KJ, Goudeva L, Schmidt-Lucke C, Kusus M, Maas R, Schwedhelm E, Stroeder D, Simon BC, Mügge A, Daniel VG, Tillmanns H, Maisch B. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: Results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am Heart J*. 2006 Sep;152(3):493.e1-8.
97. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:652 - 8.
98. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842 – 7
99. Stghlinger MC, Abbasi F, Chu JW, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002;287:1420 -6
100. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, et al. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of l-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003;57:244 - 52.
101. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, et al. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of l-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003;57:244 - 52.
102. Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska K, Leiper J, Gunther A, Grimminger F, Eickelberg O. Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L18–L24

103. Sott JA, North ML, Rafii M, Huang H, Pencharz P, Subbarao P, Belik J, Grasemann H. Asymmetric dimethylarginine is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Oct 1;184(7):779-85
104. Ahmad T, Mabalirajan U, Ghosh B, Agrawal A. Altered asymmetric dimethyl arginine metabolism in allergically inflamed mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Jan;42(1):3-8.
105. Carraro S, Giordano G, Piacentini G, Kantar A, Moser S, Cesca L, Berardi M, Di Gangi IM, Baraldi EA. Asymmetric dimethylarginine in exhaled breath condensate and serum of children with asthma. *Chest*. 2013 Aug;144(2):405-10. doi: 10.1378/chest.12-2379.
106. Scott JA¹, Duongh M², Young AW³, Subbarao P⁴, Gauvreau GM⁵, Grasemann H. Asymmetric dimethylarginine in chronic obstructive pulmonary disease (ADMA in COPD). *Int J Mol Sci*. 2014 Apr 10;15(4):6062-71. doi: 10.3390/ijms15046062.
107. Grasemann H , Schwiertz R , Grasemann C , Vester U , Racké K, Ratjen F . Decreased systemic bioavailability of L-arginine in patients with cystic fi brosis . *Respir Res* . 2006 ; 7 : 87
108. Grasemann H, Schwiertz R, Matthiesen S, Racké K, Ratjen F. Increased arginase activity in cystic fibrosis airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Dec 15;172(12):1523-8
109. Grasemann H , Kurtz F , Ratjen F . Inhaled l –arginine improves exhaled nitric oxide and pulmonary function in patients with cystic fi brosis . *Am J Respir Crit Care Med* .2006 ; 174 (2) : 208 - 212 .
110. Bonestroo HJC, de Winter-de Groot KM, Van der Ent CK, Arets GM: Upper and lower airway cultures in children with cystic fibrosis: Do not neglect the upper airways. *Journal of Cystic Fibrosis* 2010 Mar; 9(2): 130-134
111. C.G. Nair , C. Chao , B. Ryall and H.D. Williams. Sub-lethal concentrations of antibiotics increase mutation frequency in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol*. 2013 Feb;56(2):149-54.
112. Folkesson, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N and Molin S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Dec;10(12):841-51.
113. Campódonico VL, Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Uluer A, and Pier GB. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med*. 2008 Mar;14(3):120-3.
114. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur. Respir. J*. 2004; 23:146–158.
115. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, Greene C, McElvaney G, Mall M, Döring G: Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis* 2012 Sep; 11(5): 363-382
116. Aanæs K: Bacterial sinusitis can be a focus for initial lung colonization and chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2013 Sep; 12: S1-S20

117. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T: *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 2010 Nov; 5(11): 1663-74
118. Hauber HP, Lavigne F, Hung HL, Levitt RC, Hamid Q: Effect of Th2 type cytokines on hCLCA1 and mucus expression in cystic fibrosis airways. *Journal of Cystic Fibrosis* 2010 Jul; 9(4): 277-279
119. Ciofu O, Hansen CR, Høiby N: Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2013 May; 19(3): 251-8
120. Koch C. Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* 34, 232–236 (2002).
121. UK Cystic Fibrosis Registry: Annual Data Report 2011
122. Cifani N, Pompili B, Anile M, Patella M, Diso D, Venuta F, Cimino G, Quattrucci S, Di Domenico EG, Ascenzioni F, Del Porto P. Reactive-oxygen-species-mediated *P. aeruginosa* killing is functional in human cystic fibrosis macrophages. *PLoS One.* 2013 Aug 19;8(8):e71717.
123. Van de Weert-van Leeuwen PB, Van Meegen MA, Speirs JJ, Pals DJ, Rooijackers SH, Van der Ent CK, Terheggen-Lagro SW, Arets HG, Beekman JM. Optimal complement-mediated phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by monocytes in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013 Sep;49(3):463-70.
124. Scott FW, Pitt TL: *Pseudomonas Aeruginosa: Basic Research*. In: *Cystic fibrosis in the 21st century*. Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A eds. *Prog Respir Res*. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 138-144.
125. Kowalski MP, Pier GB. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *J. Immunol.* 2004; 172:418–425.
126. Pier GB, et al. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science.* 1996; 271:64–67
127. Reiniger N, et al. Influence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on gene expression in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection of human bronchial epithelial cells. *Infect. Immun.* 2005
128. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Molin S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Dec;10(12):841-51.
129. Doring, G., Taccetti, G., Campana, S., Festini, F. & Mascherini, M. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur. Respir. J.* 27, 653 (2006).
130. Munck, A. et al. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. *Pediatr. Pulmonol.* 32, 288–292 (2001).

131. Parad RB, et al. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect. Immun.* 1999; 67:4744–4750.
132. Marvig RL, Johansen HK, Molin S, Jelsbak L. Genome analysis of a transmissible lineage of *pseudomonas aeruginosa* reveals pathoadaptive mutations and distinct evolutionary paths of hypermutators. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003741.
133. Llanes C, Pourcel C, Richardot C, Plésiat P, Fichant G, Cavallo JD, Mérens A; GERPA Study Group. Diversity of β -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Aug;68(8):1763-71.
134. Pitt TL, Sparrow M, Warner M et al. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* 2003; 58: 794–6.13,37,45
135. Horsley AR, Davies JC, Gray RD, Macleod KA, Donovan J, Aziz ZA, Bell NJ, Rainer M, Mt-Isa S, Voase N, Dewar MH, Saunders C, Gibson JS, Parra-Leiton J, Larsen MD, Jeswiet S, Soussi S, Bakar Y, Meister MG, Tyler P, Doherty A, Hansell DM, Ashby D, Hyde SC, Gill DR, Greening AP, Porteous DJ, Innes JA, Boyd AC, Griesenbach U, Cunningham S, Alton EW. Changes in physiological, functional and structural markers of cystic fibrosis lung disease with treatment of a pulmonary exacerbation. *Thorax.* 2013 Jun;68(6):532-9.
136. Ratjen F1, Saiman L, Mayer-Hamblett N, Lands LC, Kloster M, Thompson V, Emmett P, Marshall B, Accurso F, Sagel S, Anstead M. Effect of azithromycin on systemic markers of inflammation in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest.* 2012 Nov;142(5):1259-66.
137. Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, Kronmal RA, Konstan MW, Burns JL, Sagel SD, Ramsey BW. Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Apr 15;175(8):822-8.
138. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, Buhl R, Schmitt-Grohé S, Zielen S, Schubert R. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine.* 2010 May;50(2):152-7.
139. Johnson GR, Morawska L. The mechanism of breath aerosol formation. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 22: 229–237, 2009
140. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, Becher G, van Beurden WJ, Corradi M, Dekhuijzen R, Dweik RA, Dwyer T, Effros R, Erzurum S, Gaston B, Gessner C, Greening A, Ho LP, Hohlfeld J, Jöbsis Q, Laskowski D, Loukides S, Marlin D, Montuschi P, Olin AC, Redington AE, Reinhold P, van Rensen EL, Rubinstein I, Silkoff P, Toren K, Vass G, Vogelberg C, Wirtz H; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005 Sep;26(3):523-48

141. Patel K, Davis SD, Johnson R, and Esther Jr CR. Exhaled Breath Condensate Purines Correlate with Lung Function in Infants and Preschoolers *Pediatr Pulmonol.* 2013 February ; 48(2): 182–187.
142. Ono E1, Mita H, Taniguchi M, Higashi N, Tsuburai T, Miyazaki E, Kumamoto T, Akiyama K. Comparison of cysteinyl leukotriene concentrations between exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Exp Allergy.* 2008 Dec;38(12):1866-74
143. Grob NM, Aytekin M, Dweik RA. Biomarkers in exhaled breath condensate: a review of collection, processing and analysis. *J Breath Res.* 2008 Sep;2(3):037004.
144. Carpagnano GE, Barnes PJ, Francis J, Wilson N, Bush A, Kharitonov SA. Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: a new noninvasive marker of airway inflammation? *Chest* 2004; 125: 2005–10
145. Bodini A, D'Orazio C, Peroni DG, Corradi M, Zerman L, Folesani G, Assael BM, Boner AL, Piacentini GL. IL-8 and pH values in exhaled condensate after antibiotics in cystic fibrosis children. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007 Jul-Sep;20(3):467-72.
146. Horak F Jr, Moeller A, Singer F, Straub D, Höller B, Helbich TH, Schneider B, Eichler I, Wildhaber JH, Hall GL. Longitudinal monitoring of pediatric cystic fibrosis lung disease using nitrite in exhaled breath condensate. *Pediatr Pulmonol.* 2007 Dec;42(12):1198-206.
147. Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, Hodson ME, Kharitonov SA. Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Apr 15;167(8):1109-12
148. Moeller A , Franklin P , Hall GL , Horak F Jr , Wildhaber JH , Stick SM . Measuring exhaled breath condensates in infants . *Pediatr Pulmonol .* 2006 ; 41 (2) : 184 – 187
149. Wilkinson TM, Donaldson GC, Hurst JR, Seemungal TA, Wedzicha JA. Early therapy improves outcomes of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1298–303.
150. Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax.* 2007 Apr;62(4):360-7.
151. Di Gangi M, Pirillo P, Carraro S, Gucciardi A, Naturale M, Baraldi E, Giordano G. Online trapping and enrichment ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for sensitive measurement of “arginine-asymmetric dimethylarginine cycle” biomarkers in human exhaled breath condensate. *Analytica Chimica Acta (2012); 754: 67– 74.*
152. Bilton D, Canny G, Conway S, Dumcius S, Hjelte L, Proesmans M, Tümmler B, Vavrova V, De Boeck K. 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

153. American Thoracic Society; European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Apr 15;171(8):912-30.
154. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J; ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.* 2005 Aug;26(2):319-38.
155. Di Gangi M, Chiandetti L, Gucciardi A, Moret V, Naturale M, Giordano G.: Simultaneous quantitative determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (2010); 667: 140–148
156. Corradi M, Pignatti P, Manini P, Andreoli R, Goldoni M, Poppa M, Moscato G, Balbi B, Mutti A. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Resp J* 2004; 24: 1011–1017.
157. Simpson JL, Wood LG, Gibson PG. Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva. *Clin Exp Allergy.* 2005 Sep;35(9):1180-1185
158. Balfour-Lynn IM, Lavery A, Dinwiddie R. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1996 Oct;75(4):319-228.
159. Leiper JM, Vallance P. The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2006;62: 33 – 38.
160. Morris CR, Poljakovic M, Lavrishia L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004;170:148–153.
161. Scott JA, North ML, Rafii M, Huang H, Pencharz P, Subbarao P, Belik J, Grasemann H. Asymmetric dimethylarginine is increased in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011;184(7):779-785.
162. Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol. Ther.* 2007;114(3):295–306.
163. Scott JA, North ML, Rafii M, Huang H, Grasemann H. Plasma arginine metabolites reflect airway dysfunction in murine model of allergic airway inflammation. *J. Appl. Physiol.* 2015;118(10):1229-1233.
164. Lüneburg N, Xanthakis V, Schwedhelm E, Sullivan LM, Maas R, Andersohn M, Riederer U, Glazer NL, Vasan RS, Böger RH. Reference intervals for plasma L-arginine and the L-arginine:asymmetric dimethylarginine ratio in the Framingham Offspring Cohort. *J Nutr.* 2011 Dec;141(12):2186-90
165. Oral L-arginine supplementation in cystic fibrosis patients: a placebo-controlled study. Grasemann H, Grasemann C, Kurtz F, Tietze-Schillings G, Vester U, Ratjen F. *Eur Respir J.* 2005 Jan;25(1):62-8.

166. Little JA, Hauser KP, Martyr SE, Harris A, Maric I, Morris CR, Suh JH, Taylor J, Castro O, Machado R, Kato G, Gladwin MT. Hematologic, biochemical, and cardiopulmonary effects of L-arginine supplementation or phosphodiesterase 5 inhibition in patients with sickle cell disease who are on hydroxyurea therapy. *Eur J Haematol*. 2009 Apr;82(4):315-21
167. Everard ML, Donnelly D . A pilot study of oral L-arginine in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2005 Mar;4(1):67-9.
168. Carraro S, Rezzi S, Reniero F, Héberger K, Giordano G, Zanconato S, Guillou C, Baraldi E. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 May 15;175(10):986-90.
169. Esther CR Jr, Boysen G, Olsen BM, Collins LB, Ghio AJ, Swenberg JW, Boucher RC. Mass spectrometric analysis of biomarkers and dilution markers in exhaled breath condensate reveals elevated purines in asthma and cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Jun;296(6):L987-93
170. Wetmore DR, Joseloff E, Pilewski J, Lee DP, Lawton KA, Mitchell MW, Milburn MV, Ryals JA, Guo L. Metabolomic profiling reveals biochemical pathways and biomarkers associated with pathogenesis in cystic fibrosis cells. *J Biol Chem*. 2010 Oct 1;285(40):30516-22
171. Montuschi P, Paris D, Melck D, Lucidi V, Ciabattini G, Raia V, Calabrese C, Bush A, Barnes PJ, Motta A. NMR spectroscopy metabolomic profiling of exhaled breath condensate in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Thorax*. 2012 Mar;67(3):222-8.
172. Robroeks CM, van Berkel JJ, Dallinga JW, Jöbsis Q, Zimmermann LJ, Hendriks HJ, Wouters MF, van der Grinten CP, van de Kant KD, van Schooten FJ, Dompeling E. Metabolomics of volatile organic compounds in cystic fibrosis patients and controls. *Pediatr Res*. 2010 Jul;68(1):75-80.
173. Tiddens H a WM, Donaldson SH, Rosenfeld M, Paré PD. Cystic fibrosis lung disease starts in the small airways: can we treat it more effectively? *Pediatr Pulmonol* 2010;45:107–17.
174. de Jong P a, Lindblad a, Rubin L, Hop WCJ, de Jongste JC, Brink M, Tiddens H a WM. Progression of lung disease on computed tomography and pulmonary function tests in children and adults with cystic fibrosis. *Thorax* 2006;61:80–5.
175. Eichinger M, Heussel C-P, Kauczor H-U, Tiddens H, Puderbach M. Computed tomography and magnetic resonance imaging in cystic fibrosis lung disease. *J Magn Reson Imaging* 2010;32:1370–8.
176. Davis SD ,Fordham LA, Brody AS, Noah TL, Retsch-Bogart GZ, Qaqish BF, Yankaskas BC, Johnson RC, Leigh MW: Computed tomography reflects lower air way inflammation and tracks changes in early cystic fibrosis. *Am J respir Crit Care Med* 2007; 175: 943-950.
177. Kuo W, Ciet P, Tiddens H a WM, Zhang W, Guillerman RP, van Straten M. Monitoring cystic fibrosis lung disease by computed tomography. Radiation risk in perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:1328–36

178. Klein M, Cohen-Cymerknoh M, Armoni S, Shoseyov D, Chisin R, Orevi M, Freedman N, Kerem E. 18F-fluorodeoxyglucose-PET/CT imaging of lungs in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2009 Nov;136(5):1220-8
179. Belessis Y, Dixon B, Hawkins G, Pereira J, Peat J, MacDonald R, Field P, Numa A, Morton J, Lui K, Jaffe A. Early cystic fibrosis lung disease detected by bronchoalveolar lavage and lung clearance index. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:862–873.
180. Brody AS, Kosorok MR, Li Z: Reproducibility of a scoring system for computed tomography scanning in cystic fibrosis. *J Thorac Imaging* 2006; 21: 14–21.
181. Brody AS, Tiddens HA, Castile RG, Coxson HO, de Jong PA, Goldin J, Huda W, Long FR, McNitt-Gray M, Rock M, Robinson TE, Sagel SD: Computed tomography in the evaluation of cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1246–1252
182. O'Connell OJ, McWilliams S, McGarrigle A, O'Connor OJ, Shanahan F, Mullane D, Eustace J, Maher MM, Plant BJ: Radiologic Imaging in Cystic Fibrosis: Cumulative Effective Dose and Changing Trends Over 2 Decades. *Chest* 2012 Jun; 141(6): 1575-83.
183. de Jong PA, Mayo JR, Golmohammadi K, Nakano Y, Lequin MH, Tiddens HA, Aldrich J, Coxson HO, Sin DD: Estimation of cancer mortality associated with repetitive computed tomography scanning. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 199–203.
184. Swift AJ, Woodhouse N, Fichele S, Siedel J, Mills GH, van Beek EJ, Wild JM: Rapid lung volumetry using ultrafast dynamic magnetic resonance imaging during forced vital capacity maneuver: correlation with spirometry. *Invest Radiol* 2007; 42: 37–41
185. Eichinger M Eichinger M, Heussel CP, Kauczor HU, Tiddens H, Puderbach M: Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging in Cystic Fibrosis Lung Disease. *J. Magn. Reson. Imaging* 2010; 32:1370–1378.
186. Wielpütz MO, Eichinger M, Puderbach M: Magnetic Resonance Imaging of Cystic Fibrosis Lung Disease. *J Thorac Imaging*. 2013 May;28(3):151-9.
187. Eichinger M, Optazait DE, Kopp-Schneider A, Hintze C, Biederer J, Niemann A, Mall MA, Wielpütz MO, Kauczor HU, Puderbach M: Morphologic and functional scoring of cystic fibrosis lung disease using MRI. *Eur J Radiol*. 2012 Jun; 81(6): 1321-9.
188. Bammer R: Basic principles of diffusion-weighted imaging. *Eur J Radiol*. 2003; 45: 169-184.
189. Attariwala R, Picker W. Whole body MRI: Improved lesion detection and characterization with diffusion weighted techniques. *J Magn Reson Imaging* 2013;38:253–268.
190. Oto A, Kayhan A, Williams JT, Fan X, Yun L, Arkani S, Rubin DT: Evaluation by Diffusion Weighted Imaging and Quantitative Dynamic Contrast Enhanced MR Imaging. *J Magn Reson Imaging*. 2011 Mar;33(3):615-24.

191. Ciet P, Serra G, Bertolo S, Spronk S, Ros M, Fraioli F, Quattrucci S, Assael MB, Catalano C, Pomerri F, Tiddens HA, Morana G. Assessment of CF lung disease using motion corrected PROPELLER MRI: a comparison with CT. *Eur Radiol*. 2015 May 30. [Epub ahead of print]
192. Rosenfeld M, Emerson J, Williams-Warren J, Pepe M, Smith A, Montgomery AB, Ramsey B: Defining a pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2001 Sep; 139(3): 359-65
193. Tepper L a., Ciet P, Caudri D, Quittner AL, Utens EMWJ, Tiddens H a. WM. Validating chest MRI to detect and monitor cystic fibrosis lung disease in a pediatric cohort. *Pediatr Pulmonol* 2015;.doi:10.1002/ppul.23328
194. Liu H, Liu Y, Yu T, Ye N. Usefulness of diffusion-weighted MR imaging in the evaluation of pulmonary lesions. *Eur Radiol* 2010;20:807–815.
195. HD Williams, JC Davies. Basic science for the chest physician: *Pseudomonas aeruginosa* and the cystic fibrosis airway. *Thorax* 2012; 67(5):465-7
196. Rasmus Lykke Marvig, Helle Krogh Johansen, Søren Molin, Lars Jelsbak Genome Analysis of a Transmissible Lineage of *Pseudomonas aeruginosa* Reveals Pathoadaptive Mutations and Distinct Evolutionary Paths of Hypermutators.
197. Langton Hewer SC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Oct 7;(4).
198. Rao P, McCaughan J, McCalmont M, Goldsmith CE, Hall V, Millar BC, McCann MA, Downey DG, Rendall JC, Elborn JS, Moore JE. Comparison of antibiotic susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF) with invasive *Pseudomonas aeruginosa* from non-CF patients. *J Cyst Fibros* 2012;1184)349-352.
199. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011;19(8):419-426.
200. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier N, Sgambati N, Miller AK, Selgrade SE, Miller SI, Denton M, Conway SP, Johansen HK, Høiby N: PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb; 56(2): 1019-30
201. Plasencia V, Borrell N, Macia MD et al. Influence of high mutation rates on the mechanisms and dynamics of in vitro and in vivo resistance development to single or combined antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2574–81
202. Jalal S, Ciofu O, Høiby, Gotoh N, Wretling B: Molecular Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000 Mar; 44(3): 710-712

203. Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*. 2009 Dec;136(6):1554-60.
204. Emerson J, McNamara S, Buccat AM, Worrell K, Burns JL. Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr Pulmonol*. 2010 Apr;45(4):363-70.
205. Taccetti G, Campana S, Marianelli L: Multiresistant non fermentative gram-negative bacteria in cystic fibrosis patients. The result of an Italian multicenter study. Italian Group for Cystic Fibrosis microbiology. *Eur J Epidemiol* 1999; 15: 85-8
206. 51 Ciofu O, Giwercman B, Pedersen SS, Høiby N. Development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during two decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF Center. *APMIS*. 1994 Sep;102(9):674-80.
207. Spencker FB, Staber L, Lietz T, Schille R, Rodloff AC: Development of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from patients with cystic fibrosis at different times. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 370-379
208. Manno G, Cruciani M, Romano L, Scapolan S, Mentasti M, Lorini R, Minicucci L. Antimicrobial use and *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility profile in a cystic fibrosis centre. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25(3):193-7
209. Muffato G, Pascoli S, Rigoli R: Procedura specifica Fibrosi Cistica. UO Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Ca' Foncello di Treviso. *Rev 3*: 2013 Nov 21
210. www.eucast.org/clinical_breakpoints. EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut off values.
211. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, Abele-Horn M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2008 Mar;7(2):123-7.
212. Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Posch J, Zarfel G, Zach M, Marth E. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients from Southeast Austria. *Wien Klin Wochenschr*. 2012 Apr;124(7-8):262-5.